

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

ROSEANE LUCIA PANINI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, EXTRAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PÉ DO MEXILHÃO
Perna perna RESPONSÁVEIS PELA FORMAÇÃO DO BISSO.**

Florianópolis

2013

ROSEANE LUCIA PANINI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, EXTRAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PÉ DO MEXILHÃO
Perna perna RESPONSÁVEIS PELA FORMAÇÃO DO BISSO.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos do Centro
de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito final a
obtenção do título de Mestre em
Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão.

Florianópolis

2013

Panini, Roseane Lucia

Caracterização morfológica, extração e identificação das proteínas do pé do mexilhão Perna perna responsáveis pela formação do bisso / Roseane Lucia Panini ; orientador, Luiz Henrique Beirão - Florianópolis, SC, 2013.

85 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mexilhão. 3. Perna perna. 4. Bisso. 5. Proteínas adesivas. I. Beirão, Luiz Henrique. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Roseane Lucia Panini

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PÉ DO MEXILHÃO *Perna perna* RESPONSÁVEIS PELA FORMAÇÃO DO BISSO.

Esta Dissertação foi julgada adequadamente para a obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 28 de Fevereiro de 2013.

Profª Drª Roseane Fett
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Henrique Beirão
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Drª Heloísa França Maltez
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cesar Damian
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luiz Henrique Beirão, meu orientador, pelos ensinamentos e oportunidade.

Ao Professor Carlos Perez Silva, pela acolhida em seu laboratório, pelos ensinamentos e pela confiança e liberdade concedidos durante a realização deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Daniel Alexandre, Daniela Florêncio, Gabriel, Mychelle Santana, Ricardo, Daniele Kunz, pela convivência feliz e toda a ajuda que me deram no desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Alcir Luiz Dalfré e ao seu aluno Rafael Trevisan, pela ajuda com a aclimação dos mexilhões.

Aos Professores Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, e Eliane M. Goldfeder, por permitirem o uso de equipamentos em seus laboratórios.

Ao Professor Hernán Fransisco Terenzi e à sua aluna Carol Tavares, pela análise de espectrometria de massa.

Ao técnico Luciano Gonzaga, pelos conselhos e pela ajuda no desenvolvimento deste projeto.

À todos os professores, técnicos e alunos da PGCAL e ao secretário Sérgio Souza que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fazenda Ostra Viva pelo fornecimento dos mexilhões.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e familiares que acreditaram em mim e que contribuíram para o encerramento de mais esta etapa em minha vida.

MUITO OBRIGADA!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

Panini, Roseane L.. Caracterização morfológica, extração e identificação das proteínas do pé do mexilhão *Perna perna* responsáveis pela formação do bisso. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Não existem colas sintéticas impermeáveis à água e às forças de turbulência das marés como as produzidas pelos mexilhões. Estes mecanismos adesivos de fixação se fazem através de fios, denominados bissos. As primeiras observações bioquímicas relataram que os bissos são formados por proteínas adesivas, colágeno e uma enzima polifenol oxidase. Aplicações propostas para estas proteínas adesivas incluem uma nova geração de adesivos cirúrgicos e ortopédicos, revestimentos de biossensores para fixação de antígenos e anticorpos para imuno diagnósticos e anti-incrustantes. Por sua vez, não existem trabalhos com este enfoque sobre o mexilhão *Perna perna*, o mais abundante Mitilidae da costa brasileira e de grande importância como recurso alimentar para as famílias locais, uma vez que é extraído como adulto para consumo direto, e como semente para o cultivo em cativeiro. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia microscópica do pé do mexilhão *P. perna*, órgão onde as proteínas adesivas do bisso são sintetizadas e armazenadas, e identificar estas prováveis proteínas adesivas usando gel de eletroforese e posterior espectrometria de massa. Na microscopia de luz foi observada a localização das células glandulares envolvidas na formação do bisso: as glândulas colágenas, enzimáticas, fenólicas e mucosas. Das proteínas extraídas do pé do mexilhão *P. perna* e separadas pela técnica de eletroforese 12% SDS-PAGE foram observadas quatro bandas de interesse: três bandas na faixa de aproximadamente 97 kDa e uma banda na faixa de aproximadamente 37 kDa. A identificação destas bandas proteicas em banco de dados, após espectrometria de massa MALDI-TOF, sugere a presença de proteínas similares às seguintes proteínas: proteína de filamento de matriz 1 (tmp-1) da espécie *Mytilus edulis*, proteína do pé do mexilhão 2 (mfp-2) da espécie *M. edulis* e proteína fibrinogênica relacionada com a proteína 1 da espécie *Mytilus californianus*.

Palavras chaves: Mexilhão. *Perna perna*. Bisso. Proteínas adesivas.

Panini, Roseane L.. **Morphological characterization, extraction and identification of the mussel foot proteins, involved with the formation of byssus in *Perna perna*.** Dissertation (Master Food Cience) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

There are no synthetic glues that can be applied to an aqueous environment and be resistant to the turbulence forces of tides such as those generated by mussels. The mussel's adhesive apparatus is a bundle of threads, called the byssus. The first biochemical observations reported those byssus are formed by a fibrous collagenous core coated with adhesive proteins and an enzyme polyphenol oxidase. Proposed applications for these adhesive proteins include a new generation of orthopedic and surgical adhesives, and coatings for biosensors for attachment of antigens and antibodies for immunoassay diagnostics and also as anticorrosive. There are no studies with this focus on the mussel *Perna perna*, the most abundant Mitilydae the Brazilian coast and of major importance as a food resource for the local families, since it is extracted as an adult for direct consumption, and as seed for cultivation farms. Therefore, the aim of this study was to describe the microscopic morphology of the foot of the mussel *P. perna*, organ where the adhesive proteins of the byssus are synthesized and stored, and to identify those probable adhesive proteins using gel electrophoresis and further mass spectrometry. In the light microscopy was observed the location of the glandular cells involved in the formation of the byssus threads: collagen, enzyme, phenol and mucous glands. The adhesive proteins extracted from the *P. perna* foot were run on 12% SDS-PAGE with detected three variants with mass around 97, and one with approximately 37 kDa. MS MALDI-TOF identification and sequence comparisons and alignments of these protein bands suggest the presence of proteins similar to the following proteins: thread matrix protein 1 (tmp-1) variants *a* from *Mytilus edulis*, mussel foot protein 2 (mfp-2) from *M. edulis* and fibrinogen-related protein 1 from *Mytilus californianus*.

Key words: Mussel. *Perna perna*. Byssus. Protein adhesive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação taxonômica da espécie <i>Perna perna</i>	27
Figura 2 - Evolução da produção de mexilhões comercializados por Santa Catarina entre 1990 e 2011 (toneladas).....	35
Figura 3 - Modelo esquemático de um bisso de mexilhão (2-3 cm comp. e 0,05-0,1 mm de diâmetro).	35
Figura 4 - Anatomia do mexilhão <i>Mytilus edulis</i> e sua estrutura bissal	36
Figura 5 - Decapeptídeos da Mfp 1. Os pontos representam as possíveis posições de hidroxilação adicional.	38
Figura 6 - Localização das proteínas adesivas do bisso: a) mfp 3 e mfp 5 são consideradas responsáveis pela adesão ao substrato (setas); mfp 2 é o núcleo da placa; mfp 1 reveste a placa e o filamento bissal; mfp 4 possivelmente interliga as proteínas colágenas que descem do fio com outras proteínas da placa; b) Visão esquemática das interações conhecidas das mfp, determinadas por Aparelho de Força de Superfície (SFA). Mfp 3 e mfp 5 responsáveis pelas interações com o substrato; apenas mfp 5 interage com mfp 3 e apenas mfp 2 interage com mfp 5; demais interações são mediadas via Ca^{2+} , Fe^{3+} e ligações cruzadas.	39
Figura 7 - Hidroxilação de resíduo tirosina em proteínas polifenólicas de <i>M. edulis</i>	40
Figura 8 - Possíveis interações de DOPA-hidroquinona: (A) complexação com metais, (B) interações de Van der Waals, (C) π -empilhamento; DOPA-quinona: reage na presença de (D) Cisteína, (E) bases de Schiff ou adição de Michael, (F) adição radical, (G) tautomerização formando 5-6-dihidroxiindol-2-carboxilato	41
Figura 9 - Ilustração esquemática de sistemas miméticos de polímeros da proteína adesiva do mexilhão. Os círculos vermelhos representam DOPA acoplados às extremidades da cadeia polimérica. A espinha dorsal do polímero é linear ou ramificada e sua composição consiste de polipeptídeos: polietilenoglicol (PEG), polimetacrilato, poliacrilato, poliacrilamida ou polimetacrilamida.	43

Figura 10 – Esquema da identificação de proteínas mostrando a digestão da proteína com tripsina; a fonte de íon, que converte a amostra a ser analisada em íons em uma fase gasosa; o analisador de massas, que separa a amostra ionizada com base na relação massa/carga (m/z); o detector, que registra o número de íons em cada valor de m/z , os quais são usados em buscas computacionais.....	45
Figura 11 - Aspecto externo de um mexilhão <i>Perna perna</i> , com suas principais características morfológicas.....	51
Figura 12 - (a) Mexilhão <i>P. perna</i> aberto. Os biscoes podem ser vistos como um conjunto de filamentos com pontas terminadas em placas adesivas. Os fios são ligados ao caule, o qual é inserido a um tronco na base do pé. (b) Detalhes do pé: (S) sulco ventral, que se estende do orifício do caule até a depressão distal (D). As linhas transversais em azul indicam onde o pé foi seccionado para a obtenção dos cortes microscópicos.....	52
Figura 13 - (a) Secção transversal na região mediana do pé. (b) Inserção mostrando a zona circundante do sulco ventral: (A) Grânulos de secreção; (B) Ductos longiturdinais; (C) Glândulas colágenas; (E) Glândulas enzimáticas; (F) Glândulas fenólicas; (M) Glândulas mucosas; (S) Sulco ventral.....	53
Figura 14 – Ductos longiturdinais que transportam as proteínas adesivas, secretadas pelas glândulas fenólicas adjacentes, até a região dos grânulos de secreção.	54
Figura 15 - Secção transversal da ponta do pé do mexilhão <i>P. perna</i>	55
Figura 16 - Local da coleta dos mexilhões cultivados no Ribeirão da Ilha e tratamentos seguintes.....	61
Figura 17 - Fluxograma da extração com PCA 0,7 % (v/v) (S = sobrenadante; P = precipitado)	62
Figura 18 - Fluxograma da extração com ácido acético 5% (v/v) e inibidores de proteases. Etapa 1: extração das proteínas mfp 1, 2, 6 e colágeno; Etapa 2: extração da proteína mfp 3.....	64
Figura 19 - Fluxograma eletroforese em mini gel de poliacrilamida 12% (m/v) SDS-PAGE.....	66

- Figura 20 - Gel de eletroforese 12% SDS-PAGE das proteínas do pé do mexilhão *P. perna*. (MM) Marcadores de baixa massa molar; Raia 1, proteínas extraídas por PCA 0,7% (v/v); Raias 2 a 5, proteínas extraídas por ácido acético/inibidores de proteases; Raia 2, sem corte dos bissos; Raia 3, com corte dos bissos; Raia 4, proteínas extraídas na etapa 2, sem corte do bisso; Raia 5, proteínas extraídas na etapa 2, com corte do bisso.**69**
- Figura 21 - Proteínas totais (mg/mL) das amostras de proteínas do pé do mexilhão *P. perna*. (1), proteínas extraídas por PCA 0,7% (v/v); (2 a 5), proteínas extraídas por ácido acético/inibidores de proteases; (2), sem corte dos bissos; (3), com corte dos bissos; (4), proteínas extraídas na etapa 2, sem corte do bisso; (5), proteínas extraídas na etapa 2, com corte do bisso.**70**
- Figura 22 - Perfil de separação de proteínas do pé do mexilhão *P. perna* através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS-PAGE. Raia 1: marcadores de baixa massa molar; Raia 2: amostra de proteína extraída por PCA 0,7% do pé de mexilhão e coradas em Coomassie Blue R-250; Raia 3: amostra da proteína eluída a partir da banda de proteína removida da faixa de 97 kDa da raia 2 e corada com prata (somente para registro de imagem); Raia 4, amostra da proteína eluída a partir da banda de proteína removida da faixa de 37 kDa da raia 2 e corada com prata (somente para registro de imagem).**71**
- Figura 23 - Em destaque está a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína da banda A (Query) com os peptídeos da tmp 1 variante *a* da espécie *M. edulis* (Sbjct)).**74**
- Figura 24 - Em destaque está a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína B (Query) com os peptídeos da proteína mfp-2 da espécie *M. edulis* (Sbjct).**74**
- Figura 25 - Em destaque está a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína C (Query) com os peptídeos da proteína mfp-2 da espécie *M. edulis* (Sbjct).**75**
- Figura 26 - Em destaque esta a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína D (Query) com a proteína fibrogênica relacionada com a proteína 1 da espécie *M. californianus* (Sbjct).**75**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa molecular (kDa), sequência e suas repetições em tandem de fp 1's de sete espécies de mexilhão marinho (A=Ala, K=Lis, S=Ser, P=Pro, Y = Tir, Y' = resíduos de tirosina alvo de hidroxilação para formação do aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina - DOPA).....	38
Tabela 2 - Proteínas do gênero <i>Mytilus</i> . (Me, <i>Mytilus edulis</i> ; Mc, <i>Mytilus californianus</i> ; Mg, <i>Mytilus galoprovincialis</i> ; Modificações pós-traducionais: Y' = DOPA, O* = <i>trans</i> -4-hidroxiprolina ou <i>trans</i> -2,3- <i>cis</i> -3,4-dihidroxiprolina).....	60
Tabela 3 - Bandas de proteínas (obtidas na Figura 22) analisadas por MALDI-TOF e identificadas por busca em banco de dados NCBI.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
BLAST	Ferramenta local básica da busca do alinhamento
DOPA	3,4-dihidrifenilalanina (Dopamina)
DTT	Ditiotreitol
EM	Espectrometria de massa
fp-1's	<i>Foot proteins 1</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight</i>
Mefp 1	<i>Mytilus edulis</i> foot protein 1
Mfp 1	<i>Mussel foot protein 1</i>
Mfp 2	<i>Mussel foot protein 2</i>
Mfp 3	<i>Mussel foot protein 3</i>
Mfp 4	<i>Mussel foot protein 4</i>
Mfp 5	<i>Mussel foot protein 5</i>
Mfp 6	<i>Mussel foot protein 6</i>
NBT	Nitrozol de tetrazólio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm ⁻²	Newton por metro quadrado
PCA	Ácido perclórico
PEG	Polietilenoglicol
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
preCOL-D	Colágeno pré-polimerizado - porção distal
preCOL-NG	Colágeno pré-polimerizado – porção não classificado
preCOL-P	Colágeno pré-polimerizado – porção proximal
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)
SFA	Aparelho de força de superfície
TFA	Ácido trifluoracético
Tmp-1	<i>Thread matrix protein 1</i> (proteína da matriz do filamento-1)
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano

LISTA DE ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Ácido glutâmico	E
Glutamina	Q
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

SUMÁRIO

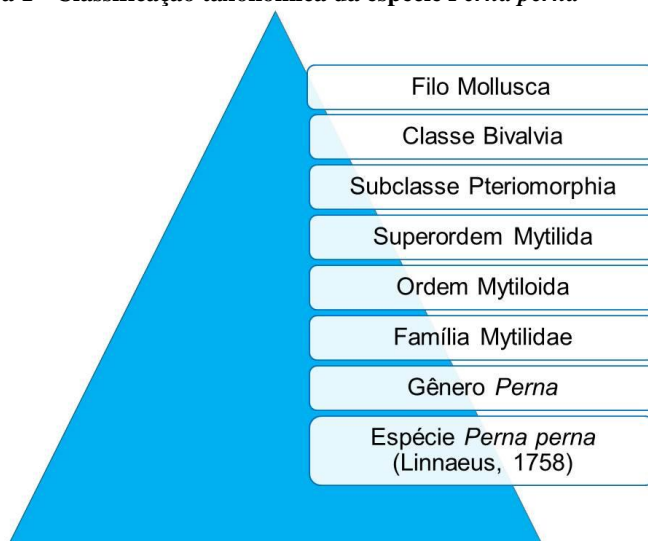
INTRODUÇÃO	27
CAPÍTULO I	31
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
1.1. Mexilhão <i>Perna perna</i>	33
1.2. Bisso	35
1.3. Proteínas do bisso	37
1.4. Aminoácido 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA)	39
1.5. Aplicações das proteínas polifenólicas adesivas	41
1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	44
1.7. Espectrometria de massas na análise de proteínas	45
CAPÍTULO II	47
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO PÉ DO MEXILHÃO <i>Perna perna</i>	47
2.1 Introdução	49
2.2 Material e Métodos	50
2.3 Resultados e Discussão	50
CONCLUSÃO	56
CAPÍTULO III	57
EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS ADESIVAS DO BISSO DO MEXILHÃO	57
<i>Perna perna</i>	57
3.1 Introdução	59
3.2 Material e Métodos	61
3.2.1 Amostras	61
3.2.2 Extração por ácido perclórico 0,7% (v/v) (PCA 0,7% (v/v))	62

3.2.3 Extração por ácido acético 5 % (v/v) e enzimas inibidoras de protease.....	63
3.2.4 Quantificação de proteínas.....	64
3.2.5 Quantificação do aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA).....	64
3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (m/v) SDS-PAGE.....	65
3.2.7 Purificação das proteínas	65
3.2.8 Digestão <i>in gel</i> , espectrometria de massa e identificação das proteínas	66
3.3 Resultados e Discussão.....	67
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77

INTRODUÇÃO

De acordo com a classificação taxonômica (Figura 1), o mexilhão da espécie *Perna perna* está inserido no Filo *Mollusca* que compreende de oitenta a cem mil espécies e é o maior grupo de animais depois do Filo *Arthropoda*, que é o filo dos insetos, crustáceos, aracnídeos, etc. (MAGALHÃES, 1985). O mexilhão pertence à classe *Bivalvia* e vive exclusivamente na água. Possui concha formada por duas valvas unidas dorsalmente por um ligamento, geralmente são de sexos separados, com raros casos de hermafroditismo e sua fecundação ocorre livremente na água (LUNETTA, 1969).

Figura 1 - Classificação taxonômica da espécie *Perna perna*



Fonte: MAGALHÃES, 1985.

O termo mexilhão é comumente utilizado na denominação de diversas espécies bivalves pertencentes à família *Mytilidae*. Dentro dessa família existem diversas espécies comestíveis e de grande importância comercial, pertencentes a vários gêneros e com ampla distribuição geográfica. Dentre as espécies de mexilhão de maior importância para o estudo das proteínas adesivas estão as dos seguintes gêneros: gênero *Mytilus*, com indivíduos de espécie cosmopolita, encontrados em todos os oceanos (Ex.: *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus californianus*, *Mytilus chilensis*); gênero

Perna, com indivíduos de espécie tropical, distribuídos pelos oceanos Atlântico (costa da América do Sul e África) e Índico (África, Ásia e Oceania), além do Mar Mediterrâneo (costa africana) (Ex.: *P. perna*, *Perna viridis*, *Perna canaliculus*); gêneros *Choromytilus* e *Aulacomya*, com indivíduos de espécie sub-tropical, encontrados nos oceanos Pacífico (costa do Chile) e Índico (África do Sul e Oceania) (Ex.: *Choromytilus chorus*, *Aulacomya ater*); gênero *Geukensia*, com espécie encontrada no oceano Atlântico (costa da América do Norte) (Ex.: *Geukensia demissa*) (CARMO; COSTA; SIQUEIRA, 1994).

O mexilhão *P. perna* é a espécie predominante do litoral brasileiro, principalmente no litoral dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, sendo este último o maior produtor de mexilhões em cativeiro do Brasil (SANTA CATARINA, 2012; MARENZI, 1992).

O estudo sobre a filogenia molecular do gênero *Perna*, que indica que o mexilhão *P. perna* do Brasil e o da África se separaram entre 170 a 570 mil anos atrás (WOOD et al., 2007) e, a identificação de conchas do mexilhão *P. perna* em sítios arqueológicos no Estado de Santa Catarina (FARIAS; MAGALHÃES, 2001), reforçam que esta espécie é nativa do litoral brasileiro.

Os mexilhões vivem presos a substratos da zona intertidal, tanto em locais com forte arrebentação quanto em pontos mais abrigados, por mecanismos adesivos através de fios, denominados bissos (MARQUES, 1988).

Por ser uma cola altamente eficaz, atóxica, biodegradável e não poluente (BURZIO et al., 1997), muitos pesquisadores investigam este mecanismo adesivo do mexilhão como adesivo cirúrgico e ortopédico (WILKER, 2010) e revestimento em uma variedade de superfícies (vidro, plástico, metais, etc.) (BURZIO et al., 1990; 1996).

Pelo menos doze proteínas já foram caracterizadas, a partir dos bissos de espécies do gênero *Mytilus*, como sendo responsáveis por este mecanismo de adesão. Estas proteínas são individualmente sintetizadas por glândulas especiais localizadas no pé do animal (BROWN, 1952; WAITE; TANZER, 1981; LIN et al., 2007; SILVERMAN; ROBERTO, 2007).

Por sua vez, não existem estudos sobre as proteínas adesivas presentes no bisso do mexilhão *P. perna*. Assim, o objetivo deste presente trabalho foi descrever a morfologia do pé do mexilhão, órgão responsável pela síntese e armazenamento das proteínas do bisso, e identificar as prováveis proteínas adesivas presentes no bisso do mexilhão *P. perna*.

Atendendo a esses objetivos, o presente trabalho é apresentado na forma de capítulos:

1º Capítulo – Apresenta uma revisão bibliográfica sobre a espécie *P. perna*, bisso, proteínas adesivas e aplicações, bem como uma breve revisão sobre os princípios e conceitos da técnica de eletroforese em gel e espectrometria de massa.

2º Capítulo – Trata da caracterização morfológica do pé do mexilhão *P. perna*, mediante análise macroscópica e microscópica através da microscopia de luz.

3º Capítulo – Trata da extração das proteínas do pé do mexilhão, separação e purificação por eletroforese em gel, identificação mediante o uso da espectrometria de massa (MALDI-TOF) e tratamento dos resultados em banco de dados.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Mexilhão *Perna perna*

A classe Bivalvia é uma das sete classes de moluscos existentes e abrange indivíduos cuja concha é composta de duas valvas, comprimidas lateralmente e encaixadas em dobradiça dorsalmente, que envolvem todo o corpo (RUPPERT; BARNES, 1996). Dentre esta classe, têm-se a família Mytilidae, que se caracteriza por apresentar organismos de grande importância como fonte de alimento. As espécies de maior estudo da família em nível mundial são do gênero *Mytilus* (MARENZI, 1992), sendo *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) a de maior importância no Brasil.

Os mexilhões em geral, possuem alta fecundidade e larvas de natação livre que asseguram a ampla distribuição da prole, tanto que são comumente encontrados a aproximadamente 100 km a partir do banco de mexilhões mais próximo. Estabelecem-se em costões rochosos, em estuários e baías, muitas vezes em densidades muito altas. Sua rápida taxa de crescimento garante que não sejam superados por outras comunidades bentônicas com os quais eles estão em concorrência, embora propensos a certos predadores (caranguejos, estrelas do mar e peixes) (SPENCER, 2002).

Talvez seu maior atributo do ponto de vista de cultivo seja o mecanismo de fixação bissal. Os filamentos bissais, que com firmeza e flexibilidade ancoram o mexilhão ao seu substrato, podem ser destacados e secretados novamente para novos pontos de fixação. Isto permite aos mexilhões reposicionarem-se para obter um melhor acesso à água corrente através da obtenção de uma posição mais favorável para a alimentação ou para a extração de oxigênio (SPENCER, 2002).

Exceto por raros casos de hermafroditismo, de acordo com Garcia, Magalhães e Ferreira (1991), o mexilhão é uma espécie dióica, com os indivíduos apresentando sexos separados. Não há dimorfismo sexual externo, de forma que machos e fêmeas não podem ser distintos por características externas. No entanto, após a abertura das conchas, a separação entre machos e fêmeas é possível graças à diferença de coloração das gônadas, branco-leitosa do macho e vermelho-alaranjado da fêmea (LUNETTA, 1969). Na desova, os ovos e os espermatozoides são liberados no mar, onde a fecundação ocorre. Os estímulos mais eficientes para induzir a eliminação de gametas estão, geralmente, relacionados a estresses ambientais como aumento da temperatura da água, tendo grande resposta, também, a presença de espermatozoides da espécie na água do mar. A primeira clivagem ocorre cerca de meia hora após a fecundação e uma larva trocófora está formada cerca de 6 horas

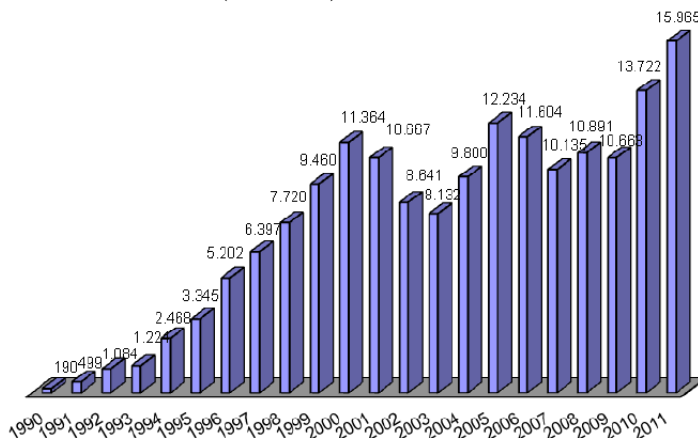
depois. A larva típica de bivalves, a véliger ou larva D pode ser observada em 24 horas após a fecundação (ARAÚJO; FERREIRA; MAGALHÃES, 1993). A partir desta etapa a larva desenvolve o órgão de natação ou velum, um anel de cílios que bate com vigor para manter a larva em suspensão, e que também é responsável pela captação do alimento, as algas de tamanho microscópico. Essa fase planctônica dura de 1 a 2 meses. Durante este tempo, a larva aumenta de tamanho (de 0,1 mm a 0,25 mm de comprimento de concha) e sofre algumas alterações morfológicas na preparação para o seu estilo de vida sedentário. O velum começa a degenerar e é eventualmente perdido. Enquanto isso surge um pé muscular (pedivéliger) que permite que a larva rasteje sobre o substrato à procura do local mais propício para o assentamento. Por fim, como primeiro sinal de metamorfose, a pedivéliger produz um muco e secreta filamentos de bisso que prendem a larva a substratos macios, como algas e náilon, e que permanecem ligados a estes substratos até atingirem de 1 a 1,5 mm de comprimento. Esta fase é conhecida como fixação primária. Após esta fase, com o crescimento do mexilhão, surgem os primeiros plantígrados que possuem o pé bastante ciliado e com grande atividade, protraindo e contraindo até o completo rastejamento. Através deste pé produzem filamentos de bisso, realizando assim a fixação secundária, que é a fixação em um substrato mais rígido, como pedras, conchas, cadeias de amarração e outras superfícies como pequenas fendas e rachaduras que lhes oferecem abrigo e proteção. Formam os chamados “bancos de mexilhões”, ficando temporariamente ou permanentemente submersos na zona entre marés (SPENCER, 2002). Estes organismos são filtradores, alimentando-se de fitoplâncton e partículas em suspensão (ARCHER E MORETTO, 1994). O tamanho médio de um mexilhão adulto da espécie *P. perna* é de 5 a 8 cm de comprimento, podendo atingir até 14 cm de comprimento e 3 cm de espessura, sendo assim o maior mitílio brasileiro (GALVÃO, 2004).

Embora o mexilhão *P. perna* seja considerado uma espécie eurihalina, ou seja, tem a capacidade de resistir a uma ampla variação de salinidade, o mexilhão não sobrevive em salinidades menores do que 19‰ e maiores do que 49‰, sendo a sua faixa ótima entre 34 e 36‰. A espécie *P. perna* é considerada euri térmica, ou seja, possui a capacidade de suportar a uma ampla variação de temperatura, resiste a uma variação de 5 a 30 °C, sendo sua faixa ótima entre 21 a 28 °C (SALOMÃO; MAGALHÃES; LUNETTA, 1980).

O mexilhão *P. perna* é uma das espécies de moluscos mais cultivadas no litoral de Santa Catarina. O cultivo teve início no ano de 1986 (MARENZI, 1992). Na década de 90 ocorreu o fortalecimento da

mitilicultura no Estado catarinense e a produção cultivada de mexilhões aumentou 23 vezes (12.126 t em 2000). A safra de 2011 foi de 15.965 toneladas representando um aumento de 16,35% em relação à safra de 2010 (Figura 2) (SANTA CATARINA, 2012).

Figura 2 - Evolução da produção de mexilhões comercializados por Santa Catarina entre 1990 e 2011 (toneladas).



Fonte: SANTA CATARINA, 2012.

1.2. Bisso

O bisso é essencialmente um fio que consiste em quatro partes: a placa adesiva, o filamento (com sua porção proximal ondulada e distal lisa), o caule e a raiz onde o caule se conecta com o animal (LEE et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Modelo esquemático de um bisso de mexilhão (2-3 cm comp. e 0,05-0,1 mm de diâmetro).



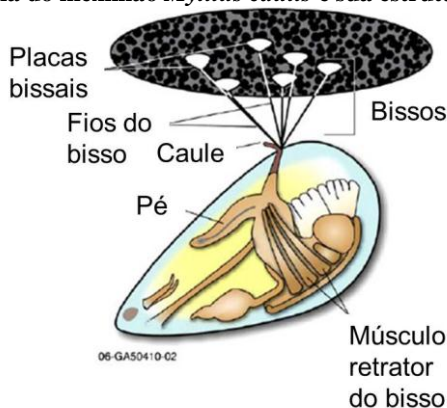
Fonte: SUN; VACCARO; WAITE, 2001.

Os filamentos bissais são estruturas flexíveis de dimensões variáveis (0,1 mm de diâmetro, 2-4 cm comprimento) constituídos de

um núcleo formado por colágeno e uma proteína de matriz, cercados por uma proteína polifenólica. Numerosos pesquisadores fotografaram o núcleo de colágeno na década de 1930 (BROWN, 1952), bem antes das únicas três proteínas colágenas serem identificadas e caracterizadas por Qin e Waite (1998, 1995). Acredita-se que as proteínas adesivas ou polifenólicas que envolvem o colágeno passem por um mecanismo de escurecimento que envolve a interação de substratos polifenólicos com uma enzima polifenol oxidase que na presença de oxigênio catalisa duas reações: 1) hidroxilação de monofenóis a difenóis e 2) oxidação de difenóis a quinonas. A reação de hidroxilação é relativamente lenta e resulta em produtos sem cor, enquanto a reação de oxidação resulta na formação de quinonas, que são coloridas. As reações subsequentes levam ao acúmulo de melanina, que é um pigmento marrom ou preto (TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).

O filamento bissal culmina em uma placa adesiva de tamanho variado, dependendo tanto do tamanho do animal quanto da idade do bisso (CRISP et al., 1985). As placas medem comumente em torno de 0,15 mm de diâmetro quando se encontram com o filamento e em torno de 2 a 3 mm na interface do substrato. A figura 4 ilustra a anatomia de um mexilhão e sua estrutura bissal.

Figura 4 - Anatomia do mexilhão *Mytilus edulis* e sua estrutura bissal



Fonte: SILVERMAN; ROBERTO, 2007.

A pesquisa mais extensa sobre as propriedades mecânicas adesivas do mexilhão tem sido com a espécie *Mytilus edulis*. A energia de ruptura do fio de bisso é de $12,5 \times 10^6 \text{ Jm}^{-3}$ versus a do tendão ($2-5 \times 10^6 \text{ Jm}^{-3}$) e a da seda ($50-180 \times 10^6 \text{ Jm}^{-3}$) (DENNY, 1988). A resistência

de ligação está entre 0,1 a $10 \times 10^6 \text{ Nm}^{-2}$, dependendo da interfase da adesão (WAITE, 1999).

Fatores ambientais, como a salinidade, temperatura, pH, estação do ano, força das ondas e o substrato, assim como fatores biológicos, como idade e estado metabólico do animal, afetam a eficiência e a força de ligação do bisso às superfícies (VAN WILKE, 1970; CRISP et al., 1985; CARRINGTON, 2002).

1.3. Proteínas do bisso

A primeira proteína adesiva isolada e caracterizada foi a da espécie *M. edulis* denominada Mefp 1 (*M. edulis* foot protein 1) (WAITE; TANZER, 1981). Outras proteínas homólogas a partir de outras espécies de mexilhões também já foram isoladas e caracterizadas (Tabela 1).

O bisso do gênero *Mytilus* contém aproximadamente de 25 a 30 proteínas diferentes. As proteínas presentes no filamento são denominadas de: *mussel foot protein* 1 ou Mfp 1 (proteína do pé do mexilhão 1); colágenos pré-polymerizados (preCOLs); e proteína da matriz do filamento (tmp 1). As proteínas presentes na placa são denominadas de mfp 2, 3, 4, 5 e 6 (LEE et. al., 2011). Todas estas proteínas contêm em comum elevado ponto isoelétrico e o aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) que é formado por uma modificação pós-traducional do aminoácido tirosina (LEE et. al., 2011).

Mfp 1, a proteína chave da cutícula bissal, é grande (~108 kDa em *M. edulis*) e básica (ponto isoelétrico = 10,5), com base na espectroscopia de massa (WAITE, 1983). Composta por repetições em tandem (umas seguidas das outras) de decapeptídeos Ala-Lis-Pro-Ser-Tir-Hip'-Hip''-Tre-DOPA-Lis, onde Hip' corresponde a trans-2,3-cis-3,4-dihidroxiprolina e Hip'' corresponde a trans-4-cis-3,4-dihidroxiprolina (Figura 5) e de repetições de hexapeptídeos Ala-Lis-Pro-Tir-DOPA-Ala (WAITE, 1987).

O núcleo fibroso do filamento bissal é formado por três tipos de colágenos pré-polymerizados denominados preCOL-D, preCOL-P e preCOL-NG. As letras distintas refletem a tendência de distribuição destes colágenos dentro do filamento, ou seja, na porção distal (D) próxima a placa, proximal (P) próxima ao caule e não classificado (NG) na porção mediana do filamento (QIN; WAITE, 1995). Proteínas da matriz, conhecidas como tmp (*thread matrix protein*), são proteínas não colagenosas interligadas ao colágeno do núcleo do filamento bissal (SARGENT; WAITE, 2009). A tmp 1 está localizada preferencialmente

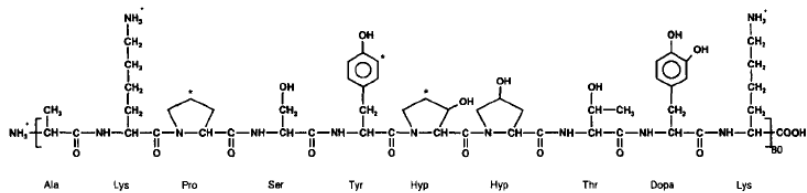
na porção proximal de cada filamento bissal e vai diminuindo da porção proximal para a porção distal (SUN; LUCAS; WAITE, 2002)

Tabela 1 - Massa molecular (kDa), sequência e suas repetições em tandem de fp 1's de sete espécies de mexilhão marinho (A=Ala, K=Lis, S=Ser, P=Pro, Y = Tir, Y' = resíduos de tirosina alvo de hidroxilação para formação do aminoácido 3,4- dihidroxifenilalanina - DOPA).

Species mfp 1	kDa	Sequência	Repetições	Referências
<i>Mytilus edulis</i>	108	AKPSY'PPYY'K	75	Laursen (1992)
		AKPYY'K	13	Filpula et al. (1990)
<i>M. galloprovincialis</i>	~90	AKPSY'PPYY'K	70	Inoue e Odo (1994)
<i>M. californianus</i>	~92	PKISY'PPYY'K	64	Zhao e Waite, observações não publicadas
<i>M. coruscus</i>		PKISY'PPYY'K	75	Inoue et al.(1996)
<i>Perna viridis</i>	64	APPPAXYAXK	14	Zhao e Waite, observações não publicadas
		AYPKPYAXK	28	Ohkawa et. al. (2004)
<i>P. canaliculus</i>	50	PY'VK	75	Zhao e Waite (2005)
<i>Geukensia demissa</i>	100	AKPSPY'VPYGY'K		Laursen (1992)
		GQQKYAY'DPGY'K	30	

Fonte: HOLTEN-ANDERSEN; WAITE, 2008.

Figura 5 - Decapeptídeos da Mfp 1. Os pontos representam as possíveis posições de hidroxilação adicional.

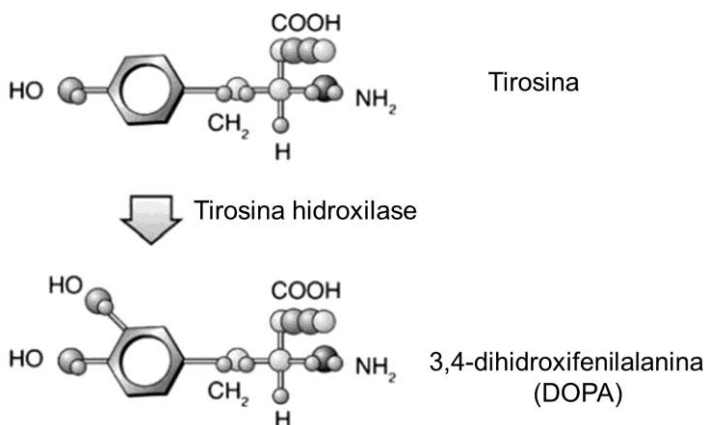


Fonte: WAITE, 1987.

A proteína do mexilhão 2 (mfp 2) é a proteína mais abundante da placa do bisso, e apresenta estrutura secundária e resistência à ação de proteases. As proteínas do mexilhão 3, 5, 6 (mfp 3, mfp 5 e mfp 6)

DOPA e superfície de Dióxido de Titânio medida por microscópio de força atômica (AFM), é extremamente alta, cerca de 805 pN, comparada com a força de dissociação de ligações covalentes de carbono-silicone (2000 pN) e as forças comparativamente fracas para descompactar as ligações de hidrogênio de cadeias de DNA (10-20 pN) (BYERN; GRUNWALD, 2010).

Figura 7 - Hidroxilação de resíduo tirosina em proteínas polifenólicas de *M. edulis*.

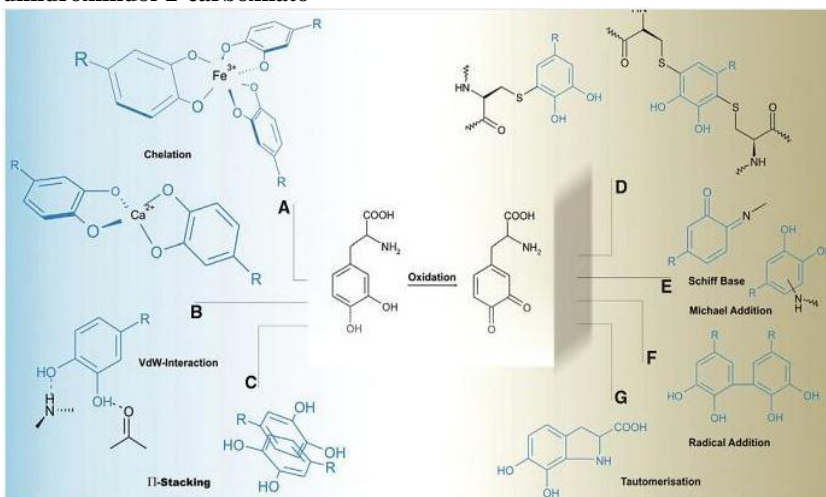


Fonte: SILVERMAN; ROBERTO, 2007.

Os grupos hidroxilas do catecol (hidroquinonas) são potenciais doadores de hidrogênio. No modo oxidado (orto-quinona) estes grupos se comportam como receptores. As ligações covalentes são obrigatórias na coesão. Elas são formadas nas proteínas adesivas dos mexilhões pela radical dimerização de duas metades catecol para formar diDOPA e por adição de Michael de amino grupos de lisina, histidina e resíduos de cisteína com orto-quinona. O entrelaçamento é induzido pela oxidação da porção catecol da orto-quinona ou por agentes como NaClO_4 ou H_2O_2 ou por via enzimática, como por exemplo, pela tirosina hidroxilase. Além disso, esta enzima tem a capacidade de modificar resíduos de tirosina em DOPA pela hidroxilação pós-traducional. Alternativamente, o entrelaçamento pode ser induzido pela adição de íons Fe (III) . Os filamentos bissais são compostos por uma camada externa que é cinco vezes mais forte do que a área interna. Este efeito depende de ligações complexométricas de íons ferro nesta área. Estes íons formam complexos estáveis com três resíduos de DOPA no disco

bissal. Devido à presença de ar, o complexo proteína-ferro é oxidado e forma espécies radicais (Figura 8). Assim, o mexilhão é um bom exemplo de onde e como substâncias polifenólicas são usadas para adesão e coesão (BYERN; GRUNWALD, 2010).

Figura 8 - Possíveis interações de DOPA-hidroquinona: (A) complexação com metais, (B) interações de Van der Waals, (C) π -empilhamento; DOPA-quinona: reage na presença de (D) Cisteína, (E) bases de Schiff ou adição de Michael, (F) adição radical, (G) tautomerização formando 5-6 dihidroxiindol-2-carboxilato



Fonte: BYERN; GRUNWALD, 2010.

1.5. Aplicações das proteínas polifenólicas adesivas

Devido ao desempenho adesivo em ambientes úmidos e turbulentos, as proteínas do bisco do mexilhão representam alvos atraentes para os esforços biomiméticos. Construções biomiméticas oferecem a oportunidade de capturar as propriedades funcionais de proteínas nativas em sistemas sintéticos, bem como para elucidar as propriedades das proteínas nativas. Esforços nesta área têm sido até agora dominados por peptídeos relativamente simples e construções de polímero contendo DOPA ou o grupo funcional catecol encontrado no DOPA, que estão sendo aceitos como um componente essencial de muitas proteínas bissais, com papéis na coesão e adesão. Com futuras pesquisas, o espaço de composição de sistemas biomiméticos certamente expandir-se-á para refletir sobre o papel de outros resíduos

de proteínas bissais (fosfoserina, lisina, histidina, hidroxarginina, etc.) e da complexa interação entre estes resíduos com DOPA (LEE et al., 2011).

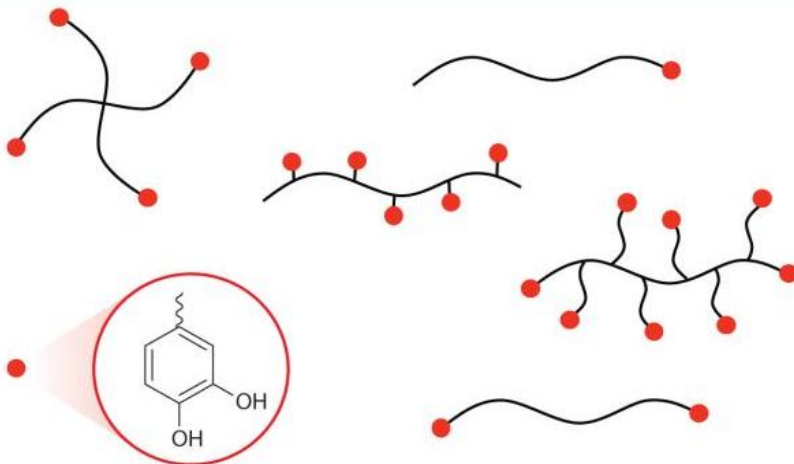
A figura 9 ilustra um modelo das configurações de polímeros miméticos sintéticos de mexilhões. Os primeiros exemplos de polímeros miméticos de mexilhões foram de polipeptídeos de DOPA quimicamente sintetizados por fase-sólida ou fase-solúvel de peptídeos químicos (YAMAMOTO, 1987; TATEHATA et al., 2000). Mais tarde, copolímeros de polipeptídeos de DOPA e lisina foram desenvolvidos por polimerização da abertura do anel de monômeros de N-carboxianidrido (YU; DEMING, 1998; YIN et al., 2009). Tecnologia de DNA recombinante também tem sido empregada para criar proteínas adesivas (MAUGH et al., 1988; FILPULA et al., 1990).

Copolímeros fornecem acesso a uma ampla gama de propriedades físicas facilmente acessíveis através de matérias primas e métodos para produção em massa. O conteúdo de catecol de polímeros sintéticos mais descritos na literatura varia de 0,5 mol% até 30 mol% ou mais, portanto, está dentro da faixa geral do conteúdo de catecol encontrado nas proteínas adesivas dos mexilhões (LEE et al., 2011).

Uma aplicação para polímeros miméticos da proteína adesiva do mexilhão é como adesivo que une as superfícies ou vedação de materiais. Adesivos médicos capazes de ligar ou reparar tecidos são considerados uma das áreas do futuro. No entanto, existem grandes desafios associados com a adesão na presença de excesso de fluídos biológicos, bem como as preocupações habituais relacionadas com a resposta biológica de polímeros sintéticos. Para aplicações médicas, deseja-se uma rápida transição sol-gel na presença de tecido, de modo a minimizar o atraso cirúrgico. Este normalmente seria realizado por administração de uma solução de polímero líquido, de preferência aquoso, que se solidifica em segundos ou décimos de segundo *in vivo*. A verdadeira oportunidade aqui reside em explorar as propriedades químicas do catecol para gerar força coesiva e adesiva na cola solidificada (LEE et al., 2011).

Recentemente, um polímero adesivo mimético de mexilhão foi investigado como um candidato a selante cirúrgico injetado para reparação de rupturas de membrana fetal em gestações (BILIC et al., 2010). O polímero adesivo PEG-catecol mostrou eficiente ligação, sem interrupções, e não tóxico para as membranas fetais. Com base nestes estudos preliminares, adesivos sintéticos PEG-catecol surgiram como uma modalidade de vedação potencial para defeitos de membrana fetal e ainda merecem uma avaliação *in vivo* (LEE et al., 2011).

Figura 9 - Ilustração esquemática de sistemas miméticos de polímeros da proteína adesiva do mexilhão. Os círculos vermelhos representam DOPA acoplados às extremidades da cadeia polimérica. A espinha dorsal do polímero é linear ou ramificada e sua composição consiste de polipeptídeos: polietilenoglicol (PEG), polimetacrilato, poliacrilato, poliacrilamida ou polimetacrilamida.



Fonte: LEE et al., 2011.

Shao, Bachus e Stewart (2009) descreveram a síntese mimética da cola secretada pelo verme do castelo de areia (‘sandcastle worm’) *P. Californica*. Assim como os mexilhões, estes organismos empregam proteínas contendo DOPA para produzir suas colas. Os autores relataram posteriormente um sistema acionado ambientalmente que exibiu boa resistência de união de ossos *in vitro* (SHAO; STEWART, 2010). Recentemente este sistema foi adaptado para a reconstrução adesiva de uma fratura craniana em um sistema modelo de rato (WINSLOW et al., 2010).

A forte adesão de superfície DOPA oferece muitas oportunidades para o desenvolvimento de revestimentos de novos polímeros úteis de maneiras variadas. Dependendo da arquitetura e composição, o catecol pode servir como uma âncora na imobilização de um revestimento de polímero sobre uma superfície ou pode dar valor adesivo para o revestimento aplicado (LEE et al., 2011).

Haeshin Lee, Bruce P. Lee e Messersmith (2007) desenvolveram um adesivo híbrido que consiste de uma matriz de conjunto de pilares nanofabricados revestidos com uma fina camada de

polímero mimético de adesivo de proteína de mexilhões. A adesão úmida das matrizes de pilares nanoestruturados de polímeros aumentou quase 15 vezes. O adesivo manteve o seu desempenho para mais de 1.000 ciclos de contato, tanto em ambientes secos quanto molhados. Este adesivo híbrido pode ser útil para a fixação reversível de uma variedade de superfícies em muitos ambientes.

Uma quantidade significativa de pesquisas tem sido realizada em revestimentos anti-incrustantes de polímeros em que PEG e outros polímeros são enxertados em superfícies através de grupos catecol funcionais (HANSEN; DEXTER; WAITE, 1995; DALSIN; MESSERSMITH, 2005; LEE; DALSIN; MESSERSMITH, 2006). Estes revestimentos podem ser formados por um ou outro enxerto e variam em espessura de alguns nanômetros a > 100 nm. Na suficientemente elevada densidade superficial de polímeros anti-incrustantes, a adesão de proteínas, células, bactérias e algas é significativamente reduzida em comparação a superfícies não modificadas. A primeira manifestação desta abordagem consistiu em um PEG acoplado a uma sequência decapeptídeo derivado da mfp 1 (LEE et al., 2011).

Âncoras de catecol funcionam igualmente bem para a fixação de polímeros em superfícies de nanopartículas, incluindo aquelas previstas para aplicações na medicina (PAUNESKU et al., 2003; YANG et al., 2008) e progressos estão sendo feitos para o desenvolvimento de polímeros miméticos de mexilhões capazes de reparar tecidos moles e duros (LEE et al., 2011).

1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE), desenvolvida por Laemmli (1970) durante seus estudos sobre a dissociação de proteínas do bacteriófago T4, é uma das técnicas mais utilizadas para separação de proteínas. As proteínas complexadas com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) são desnaturadas, apresentam carga negativa e a separação ocorre pela diferença das massas moleculares. Isto torna o SDS-PAGE em geral um método simples e uma valiosa técnica de separação protéica para determinação de massa molar. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N, N-metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

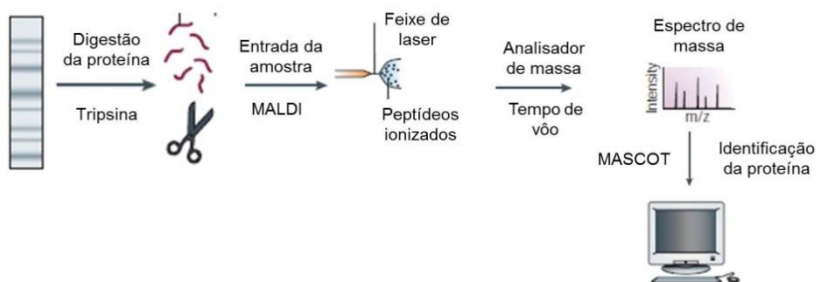
1.7. Espectrometria de massas na análise de proteínas

Os espectrômetros de massa consistem em uma fonte de íon, que converte as moléculas a serem analisadas em íons em uma fase gasosa; um analisador de massas, que separa as moléculas ionizadas com base na relação massa/carga (m/z); e um detector, que registra o número de íons em cada valor de m/z (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

Os dois tipos principais de ionizadores utilizados nas análises proteômicas são ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) e a ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization*, ESI). Os tipos de analisadores mais importantes são o tempo de voo (*time-of-flight*, TOF) e o quadrupolo (Q) (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2012).

A identificação das proteínas pode ser realizada por impressão digital do mapa peptídico (PMF), que é o método que consiste na digestão das proteínas de interesse com tripsina ou outro agente proteolítico, seguida de uma análise espectrométrica dos peptídeos obtidos pela espectrometria de massa (Figura 11). Os valores de massas molares obtidos são usados em buscas computacionais em que são comparados com resultados de digestão *in silico* das proteínas existentes em bancos de dados utilizando softwares específicos (SIUZDAK, 1996 apud MAGALHÃES, 2006).

Figura 10 – Esquema da identificação de proteínas mostrando a digestão da proteína com tripsina; a fonte de íon, que converte a amostra a ser analisada em íons em uma fase gasosa; o analisador de massas, que separa a amostra ionizada com base na relação massa/carga (m/z); o detector, que registra o número de íons em cada valor de m/z , os quais são usados em buscas computacionais.



Fonte: O autor.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO PÉ DO MEXILHÃO *Perna perna*

2.1 Introdução

Um dos mais antigos trabalhos que trata sobre o bisso é o de Antoine von Heide do ano de 1684. Ele acreditava que o bisso era uma espécie de planta com suas raízes no pé do animal, mas foi Réaumur (1711) que deu a primeira descrição exata do bisso do gênero *Mytilus*. Ele distinguiu as duas principais partes visíveis: o caule e os filamentos ligados ao caule e observou que a formação destes filamentos, denominados bissos, se dava através do sulco ventral do pé (BROWN, 1952).

Müller (1837), Tullberg (1877), Carriere (1879), Barrois (1885), Jobert (1882), Coupin (1892), Boutan (1895) e, Frierson (1903) chegaram à conclusão de que o bisso é um órgão de fixação secretado pelas glândulas especiais do pé do mexilhão (BROWN, 1952). Na verdade, os filamentos bissais são sintetizados por um conjunto de glândulas (bissogênicas), cada uma responsável por um aspecto diferente da síntese do bisso (WAITE, 1992; FERREIRA; MAGALHÃES, 2004). À medida que o bisso é sintetizado pelas glândulas especializadas, escorre por um sulco ventral existente na região mediana do pé, que serve como molde para dar a sua forma de fio (TAMARIN; KELLER, 1972; FERREIRA; MAGALHÃES, 2004). Como observado por Waite (1992), o pé produz um bisso por vez, em um processo que se assemelha a moldagem por injeção e requer cerca de 3 a 10 minutos por fio.

Desde os anos 70, as glândulas associadas à formação do bisso foram denominadas de glândulas colágenas, enzimáticas, fenólicas e glândulas mucosas, atribuindo cada uma a um tipo de secreção produzida nos respectivos tecidos (SILVERMAN; ROBERTO, 2010).

No presente trabalho, nos propomos a descrever a morfologia do pé do mexilhão *P. perna*, mediante análise macroscópica e microscópica através da microscopia de luz, para que possamos conhecer e comparar os dados obtidos com outras espécies. O preparo das lâminas com os tecidos estudados foi realizado segundo as técnicas clássicas de histologia obedecendo às seguintes etapas: fixação dos tecidos, desidratação, clarificação, inclusão, microtomia (corte em fatias finas), coloração e montagem de lâminas (BEHMER et al., 1976; TOLOSA et al., 2003).

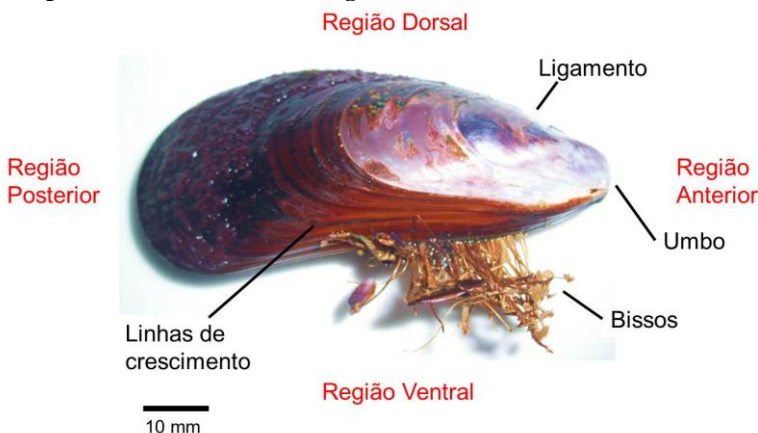
2.2 Material e Métodos

Foram escolhidos aleatoriamente dois exemplares de mexilhão *P. perna*, um macho e uma fêmea. As conchas foram abertas introduzindo uma lâmina pela região próxima à saída do bisso (região ventral), movendo-a até a região posterior dorsal até encontrar resistência, devida ao músculo dorsal adutor posterior, seccionando-o. Após abertura das conchas o pé foi dessecado e fixado em formaldeído 10% (v/v) (10 mL formaldeído 37-40% em 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,0) por um período de 8 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o tecido foi desidratado. A desidratação foi feita através de imersão do tecido em uma bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes (70% (v/v), 92,8% (v/v) e álcool absoluto). O tempo de imersão em cada concentração alcoólica foi de 30 minutos. Antes da inclusão do tecido em parafina foi feita a diafanização em xilol (uma imersão de 30 minutos seguida de outra de 20 minutos). A inclusão foi feita em duas trocas de parafina fundida mantida em estufa (56 a 60 °C) por 30 minutos cada para assegurar a substituição de todo o xilol. Uma terceira inclusão foi feita, onde o tecido foi retirado da estufa e deixado a temperatura ambiente até que a parafina endurecesse. Neste momento o tecido foi orientado de modo a permitir durante a microtomia secções transversais. Cortes histológicos de cerca de 5 mm foram obtidos em um micrótomo OLYMPUS CUT 4055 e colhidos em lâminas de vidro. As secções foram então coradas com Azur II e Azul de metileno (na proporção de 1 : 2) (TAMARIN E KELLER, 1972) e analisadas e fotografadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E-800).

2.3 Resultados e Discussão

Assim como os outros moluscos bivalves, o mexilhão não possui esqueleto interno e tem o corpo contido em uma concha formada por duas partes iguais (valvas), unidas dorsalmente por um ligamento e contendo linhas de crescimento. As linhas de crescimento se dispõem a partir do umbo, que é a parte mais antiga da valva, e representam etapas de crescimento, embora nas espécies tropicais ainda não tenha sido possível associá-las a tempos específicos de crescimento (Figura 11) (MAGALHÃES, 1985).

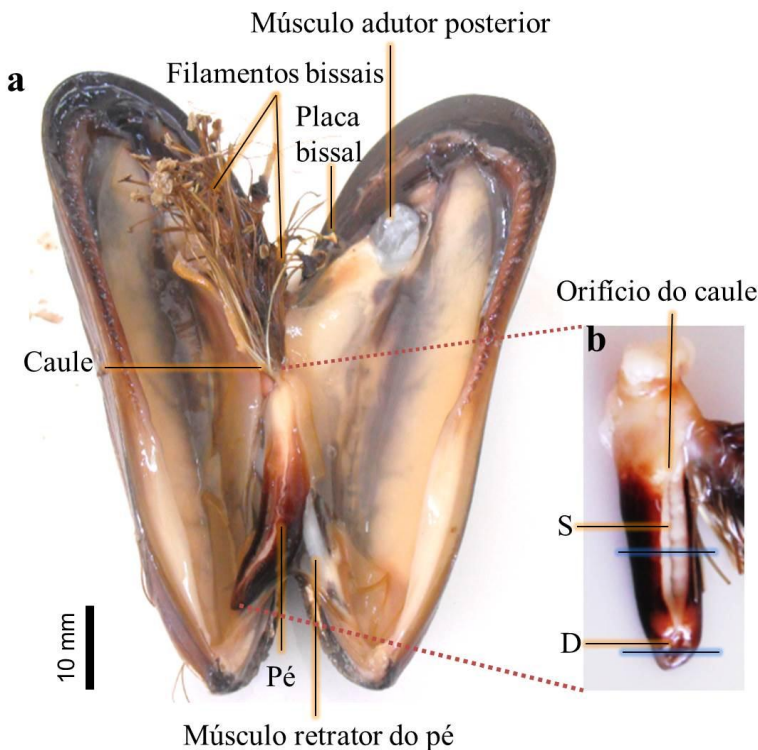
Figura 11 - Aspecto externo de um mexilhão *Perna perna*, com suas principais características morfológicas.



Com abertura da concha (Figura 12a) pode ser observado o pé que está localizado na região mediana do mexilhão ligado a um conjunto de músculos retratores de cor branca. É um órgão cilíndrico, musculoso e possui coloração marrom. Na região ventral é achatado e apresenta um sulco longitudinal (Figura 12b, S) que se estende do orifício do caule (Figura 12b) até a depressão distal (Figura 12b, D). No sulco ventral e na depressão distal é por onde escorrem as substâncias protéicas que são sintetizadas pelas glândulas do pé. O sulco ventral serve como molde para dar a forma do fio e a depressão distal para dar a forma da placa à estrutura bissal.

Uma secção transversal do pé, circundante ao sulco ventral, entre o orifício do caule e a depressão distal, é mostrada na figura 13. A posição das glândulas que formam o bisso do mexilhão *P. perna* é igual entre macho e fêmea e é semelhante à encontrada nos mexilhões *M. edulis* e *M. californianus*. Adjacente ao sulco ventral (Figura 13b, S), encontra-se uma região mais clara onde ficam os grânulos de secreção (Figura 13b, A). Neste local, as substâncias elaboradas pelas células glandulares ficam armazenadas temporariamente. A vantagem disso é poder liberar uma quantidade de material num curto intervalo de tempo em resposta a sinais adequados.

Figura 12 - (a) Mexilhão *P. perna* aberto. Os biscoes podem ser vistos como um conjunto de filamentos com pontas terminadas em placas adesivas. Os fios são ligados ao caule, o qual é inserido a um tronco na base do pé. (b) Detalhes do pé: (S) sulco ventral, que se estende do orifício do caule até a depressão distal (D). As linhas transversais em azul indicam onde o pé foi seccionado para a obtenção dos cortes microscópicos.



As glândulas que secretam o colágeno e a proteína da matriz do filamento localizam-se na parte bilateral do sulco ventral logo após os grânulos de secreção (Figura 13b, C). As glândulas enzimáticas responsáveis pela secreção de enzimas, como polifenol oxidases que catalisam as ligações entre as proteínas, localizam-se na parte posterior às glândulas colágenas (Figura 13b, E). Células das glândulas fenólicas (Figura 13b, F) estão localizadas na parte anterior às glândulas colágenas. As proteínas adesivas secretadas a partir destas células são levadas até a região dos grânulos de secreção por ductos longitudinais (Figura 13b, B; Figura 14).

Figura 13 - (a) Secção transversal na região mediana do pé. (b) Inserção mostrando a zona circundante do sulco ventral: (A) Grânulos de secreção; (B) Ductos longiturnais; (C) Glândulas colágenas; (E) Glândulas enzimáticas; (F) Glândulas fenólicas; (M) Glândulas mucosas; (S) Sulco ventral.

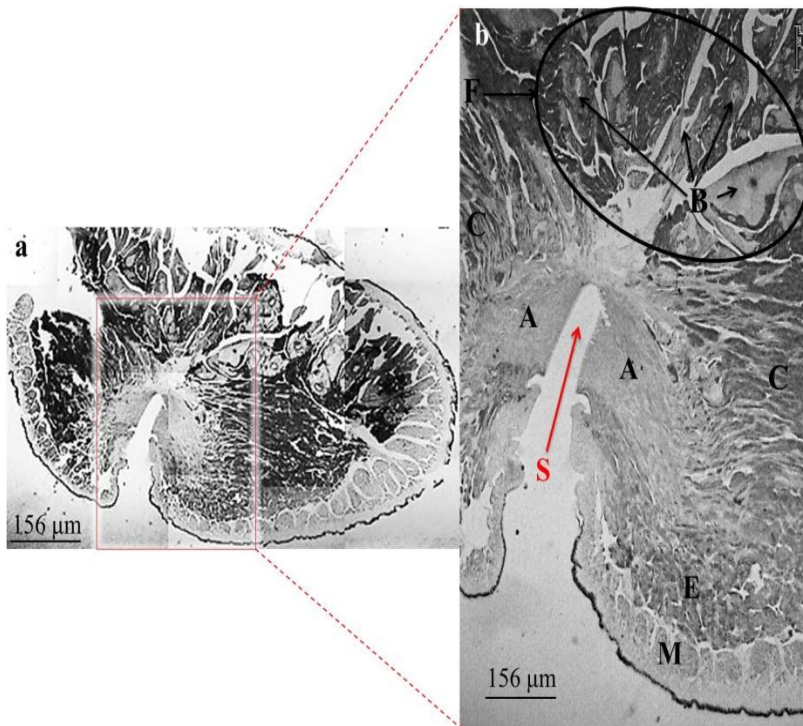
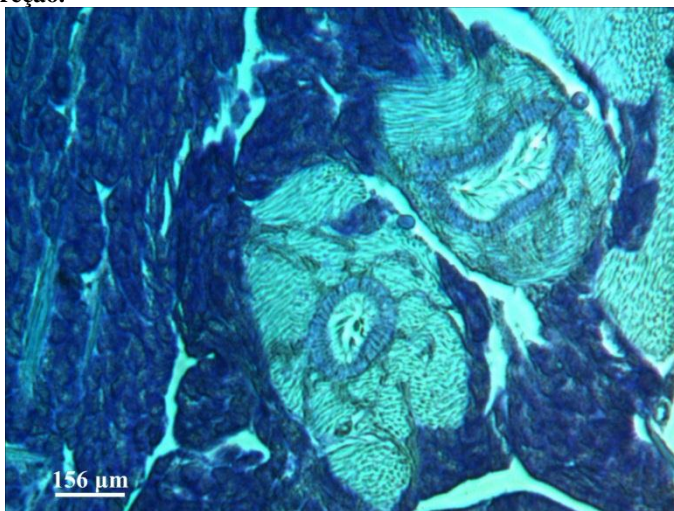


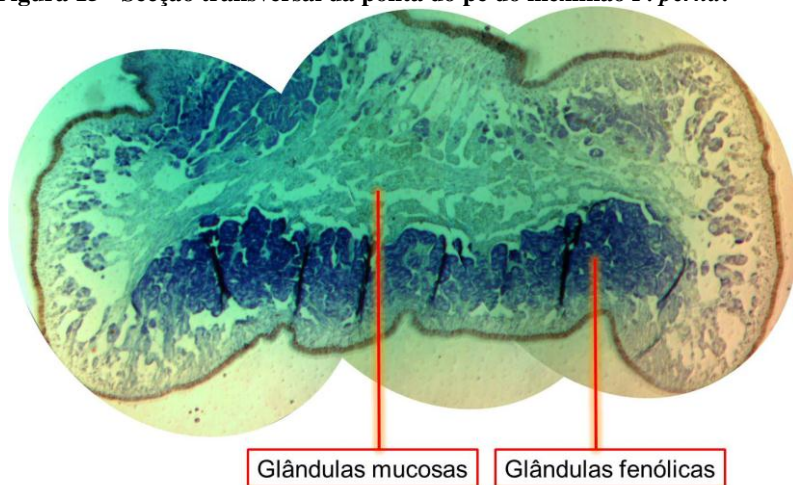
Figura 14 – Ductos longitudinais que transportam as proteínas adesivas, secretadas pelas glândulas fenólicas adjacentes, até a região dos grânulos de secreção.



A maior concentração de glândulas fenólicas é encontrada na depressão distal localizada na ponta do pé (Figura 15), onde a placa adesiva é formada.

As glândulas mucosas (Figura 13b, M; Figura 15) localizam-se próximas ao sulco ventral e na região da depressão distal. Secretam ácidos glicosaminoglicanos e glicoproteínas (WAITE, 1992), que parecem ter papel importante na preparação da superfície e no lançamento da estrutura adesiva após a formação do bisso (TAMARIN; LEWIS; ASKEY, 1976; WIEGEMANN, 2005).

Figura 15 - Secção transversal da ponta do pé do mexilhão *P. perna*.



A orientação das glândulas em relação ao molde do filamento (sulco ventral) e molde da placa (depressão distal) faz com que as suas secreções sejam liberadas espacialmente onde são necessárias: o colágeno denominado preCOL-P é liberado no sulco ventral na região próxima ao orifício do caule, o preCOL-NG na região mediana do sulco ventral e o preCOL-D próximo a placa; a proteína adesiva mfp 1 que reveste o filamento é secretada ao longo de todo o sulco ventral e as proteínas adesivas que fazem parte da placa bissal são secretadas na depressão distal (SILVERMAN; ROBERTO, 2010).

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a organização citológica das glândulas secretoras do pé do mexilhão *P. perna*, que agindo em conjunto, produzem o filamento bissal.

A posição das glândulas que formam o bisso do mexilhão é igual entre macho e fêmea e é semelhante à encontrada nas espécies do gênero *Mytilus*.

As glândulas fenólicas se concentram na parte mediana do sulco ventral à depressão distal do pé, portanto, a fim de extrair as proteínas adesivas pode-se utilizar somente esta região.

Estudos adicionais sobre a morfologia e bioquímica deste órgão são necessários, para analisarmos as estruturas celulares mais detalhadamente.

CAPÍTULO III

EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS ADESIVAS DO BISSO DO MEXILHÃO

Perna perna

3.1 Introdução

O bisso do gênero *Mytilus* contém aproximadamente 25 a 30 proteínas diferentes. As proteínas presentes no filamento bissal são denominadas de: mfp 1 (*mussel foot protein 1*); colágenos pré-polimerizados (preCOLs); e proteína da matriz do filamento (tmp 1). As proteínas presentes na placa bissal são denominadas de mfp 2, 3, 4, 5 e 6 (Tabela 2) (LEE et al., 2011). Todas estas proteínas contêm em comum elevado ponto isoelétrico e o aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) que é formado por uma modificação pós-traducional do aminoácido tirosina (LEE et al., 2011).

A mfp 1 isolada do mexilhão verde *Perna canaliculus* é composta por apenas quatro aminoácidos: 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), lisina, prolina e valina numa concentração de 20 mol% cada e, análises de SDS-PAGE e MALDI-TOF detectaram tamanhos que variam entre 48 e 52 kDa (ZHAO; WAITE, 2005).

A identificação destas proteínas tem sido o principal objetivo das pesquisas, porém a estrutura fibrosa e insolúvel do filamento bissal tem frustrado as tentativas de extraí-las diretamente do bisso (WAITE, 1983), apesar de Waite e Qin (2001) terem extraído a proteína mfp 5 diretamente da placa adesiva e, Qin e Waite (1995) terem extraído o colágeno diretamente do filamento bissal. Entretanto, como o bisso é produzido e armazenado no pé do mexilhão, este se tornou o alvo de extração das proteínas adesivas na maioria dos trabalhos.

A grande maioria das análises protéicas é realizada através de técnicas de eletroforese e espectrometria de massa. A eletroforese em gel é um método amplamente utilizado para a separação de misturas complexas de proteínas e para obtenção de suas massas molares, entre outras aplicabilidades.

A identificação das proteínas pode ser realizada por impressão digital do mapa peptídico (PMF), que é o método que consiste na digestão das proteínas de interesse com tripsina ou outro agente proteolítico, seguida de uma análise espectrométrica dos peptídeos obtidos pela espectrometria de massa. Os valores de massas molares obtidos são usados em buscas computacionais em que são comparados com resultados de digestão *in silico* das proteínas existentes em bancos de dados utilizando softwares específicos (SIUZDAK, 1996 apud MAGALHÃES, 2006).

Tabela 2 - Proteínas do gênero *Mytilus*. (Me, *Mytilus edulis*; Mc, *Mytilus californianus*; Mg, *Mytilus galoprovincialis*; Modificações pós-traducionais: Y' = DOPA, O* = *trans*-4-hidroxi prolina ou *trans*-2,3-*cis*-3,4-dihidroxi prolina)

Proteína	Espécie	Massa (kDa)	pI	Dopa (%mol)	Sequência	Número repetições
Mfp 1	Me	108	10,5	15	[AKPSY'O*OTY'K] _n	75
	Mc	90			[PKISY'O*OTY'K] _n	
Mfp 2	Mg	45	9,5	5	[TDKAYKPNPCVVSKPCKNR GKCIWNGKAYRCKCAYGY' GGRHC] _n	11
Mfp 3	Me	6		20	ADY'Y'GPNY'GPARRY'GGGNY' NRY'NRY'GRRY'GGY'KGWNN GWNRRRGKY'W	1
Mfp 4	Mc	93		2	[HVHTRVLHK] _n	36
					[DDHVNDIAQTA] _n	16
Mfp 5	Me	9	9	28	SSEYY'KGGY'Y'PGNAY'HY'SGG SY'HGSGY'HGGY'KGKY'Y'GK AKKY'Y'Y'KY'KNSGKY'KY'LKK ARKY'HRKGY'KY'Y'GGSS	1
Mfp 6	Mc	11	9,5	3	GGGNYRGYCSNKGCRSGYIF YDNRGFCKYGSSSYKYDCG NYACLPRNPYGRVKYYCTKK YSCPDDFYNNKGYYYND KDYGCFCNGSYNGCCLRSY	1
Tmp 1	Mg	57	9,5	3	[YGYGNIYGYNGYGNGKTNIIV NKSgygygngygyngyYIYYG] _n	5
					[YGNKTTKIVVNKGNGYGYD] _n	3
PreCOL-D	Me	240	10,5	<1	[GX ₁ X ₂] _n	173
PreCOL-NG	Me	230	7,5	<1	[GX ₁ X ₂] _n	143

Fonte: LEE et al., 2011

Diante disso, o presente trabalho se propõe a identificar as prováveis proteínas adesivas do bisso do mexilhão *P. perna* mediante a extração das proteínas do pé do mexilhão, separação e purificação por eletroforese em gel, identificação através da utilização da espectrometria de massa (MALDI-TOF) e do tratamento dos resultados em banco de dados.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Amostras

Indivíduos da espécie *P. perna* foram coletados em dois períodos, 30 animais em fevereiro de 2012 e 30 animais em agosto de 2012, em uma fazenda marinha de cultivo de mexilhões no bairro Ribeirão da Ilha (27°35'49"S, 48°32'56"W) na cidade de Florianópolis/SC (Figura 16).

Os mexilhões coletados em fevereiro de 2012 foram levados ao Laboratório de Química de Alimentos (CAL/CCA/UFSC) onde os pés foram imediatamente dissecados e as proteínas do pé extraídas e armazenadas a -20 °C para posterior utilização. Os mexilhões coletados em agosto de 2012 foram levados ao Laboratório de Defesas Celulares (BQA/CCB/UFSC) onde os animais foram aclimatados por dez dias.

Figura 16 - Local da coleta dos mexilhões cultivados no Ribeirão da Ilha e tratamentos seguintes.



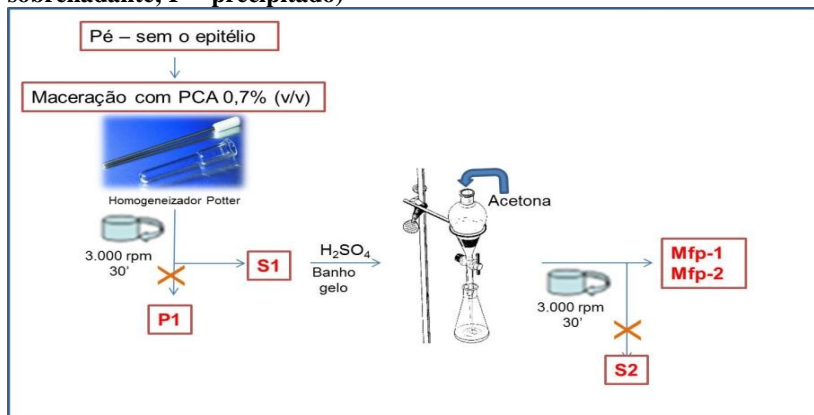
Os mexilhões foram divididos entre dois aquários de plástico de 15 litros (1 litro de água do mar por animal), com temperatura de 20 a 25 °C, aeração contínua e alimentados com solução de alga Sera Marin Coraliquid® a cada dois dias. Os biscoitos dos mexilhões de um dos aquários foram retirados já no primeiro dia, enquanto do outro aquário,

permaneceram como foram coletados. Após o período de dez dias, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Insetos (BQA/CCB/UFSC), as conchas foram abertas, os pés dissecados e congelados a -80°C para posterior utilização.

3.2.2 Extração por ácido perclórico 0,7% (v/v) (PCA 0,7% (v/v))

As proteínas do pé dos mexilhões, do primeiro lote coletado em fevereiro de 2012, foram extraídas conforme protocolo descrito por Waite (1995), com algumas modificações (Figura 17). Cerca de 15 g de pés de mexilhão despigmentados foram macerados em 150 mL de PCA 0,7 % (v/v) gelado. A amostra foi centrifugada a 2.500 g por 30 minutos. O sobrenadante (S1) e o precipitado foram separados, sendo o último descartado. O S1 foi acidificado com ácido sulfúrico concentrado para uma concentração final de $0,3\text{ mol.L}^{-1}$ e as proteínas foram precipitadas com adição de dois volumes de acetona para cada volume de sobrenadante e, em seguida, a amostra foi armazenada sob refrigeração por 20 minutos. Após este período a amostra foi centrifugada a 2.500 g por 30 minutos. O sobrenadante (S2) e o precipitado foram separados, sendo o primeiro descartado e o segundo armazenado a -20°C para posterior utilização.

Figura 17 - Fluxograma da extração com PCA 0,7 % (v/v) (S = sobrenadante; P = precipitado)



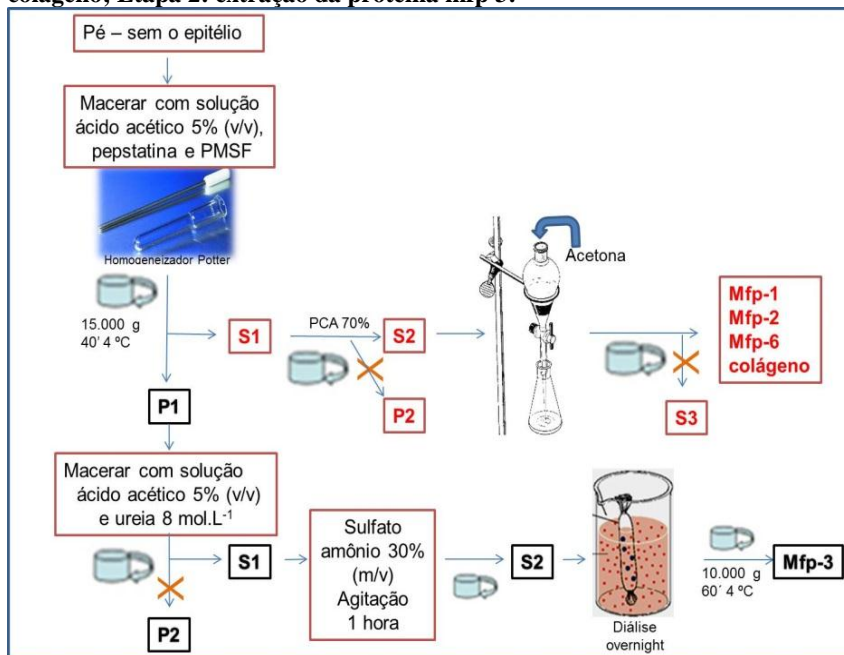
3.2.3 Extração por ácido acético 5 % (v/v) e enzimas inibidoras de protease

As proteínas do segundo lote de animais, coletados em agosto de 2012, foram extraídas conforme método descrito por Hwang et al. (2010), com algumas modificações (Figura 18). Cerca de 10 g de pés despigmentados foram cortados em pequenos pedaços e submetidos à lise mecânica (macerados) com solução gelada de 50 mL de ácido acético 5% (v/v), 200 μ L de pepstatina 10 mmol.L⁻¹ e 120 μ L de PMSF 5 mmol.L⁻¹. A amostra foi centrifugada a 15.000 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante (S1) e o precipitado (P1) foram separados. Neste momento a extração segue por duas etapas diferentes.

Etapas 1: o S1 foi acidificado com PCA 70% (v/v) para uma concentração final de 1,5% (v/v), agitado por alguns minutos e, em seguida a amostra foi centrifugada a 15.000 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante (S2) e o precipitado (P2) foram separados, sendo o último descartado. As proteínas, presentes no S2, foram precipitadas com adição de dois volumes de acetona para cada volume de sobrenadante e, em seguida armazenadas sob refrigeração por 20 minutos. Após este período a amostra foi centrifugada a 15.000 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante (S3) e o precipitado (P3) foram separados, o primeiro foi descartado e o segundo armazenado a -20 °C para posterior utilização.

Etapas 2: o P1 foi macerado com uma solução de 50 mL de ácido acético 5% (v/v) e ureia 8 mol.L⁻¹. A amostra foi centrifugada a 15.000 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo o último descartado. Adicionamos no sobrenadante uma solução de sulfato de amônio 30% (m/v) e agitamos por uma hora em temperatura ambiente. Após este período, a amostra foi centrifugada a 15.000 g por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante e o precipitado foram separados, sendo este último descartado. As proteínas presentes no sobrenadante foram dialisadas contra dois litros de água mili-Q sob refrigeração overnight. Após este período, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido a -20 °C para posterior utilização.

Figura 18 - Fluxograma da extração com ácido acético 5% (v/v) e inibidores de proteases. Etapa 1: extração das proteínas mfp 1, 2, 6 e colágeno; Etapa 2: extração da proteína mfp 3.



3.2.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como padrão. A reação foi conduzida pela adição de 20, 50, 80 µL de amostra e 500 µL do reagente de Bradford e incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. A leitura das absorbâncias resultantes foi lida a 595 nm em placa de 96 poços transparentes no aparelho de leitura de placa Tecan (Infinite).

3.2.5 Quantificação do aminoácido 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA)

A quantificação de aminoácido DOPA foi realizada segundo o método colorimétrico de Arnou (1934) usando dopamina (19 mg em 100 mL de água destilada) como padrão. A reação foi conduzida pela adição de 20, 50, 80 µL de amostra, 100 µL de 0,5 N de HCl, 100 µL de

reagente nitrito-molibdato (uma cor amarela se forma neste ponto), 100 μL de 1 N NaOH (resulta numa cor vermelha) e 100 μL água destilada. A leitura das absorbâncias resultantes foi lida a 420 nm em placa de 96 poços transparentes no aparelho de leitura de placa Tecan (Infinite).

3.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (m/v) SDS-PAGE

Uma alíquota da amostra extraída com PCA 0,7% (v/v) foi ressuspensa em água destilada e tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 mmol.L^{-1} pH 6,8, 100 μL SDS 10% (m/v), 100 μL glicerol, 0,005 mg de azul de bromofenol e água destilada suficiente para 1,0 mL) numa proporção de 3:1.

A alíquota da amostra extraída com ácido acético 5% (v/v)/inibidores de proteases foi ressuspensa em ácido acético 5% (v/v) e tampão de amostra (3:1). As amostras foram aquecidas a 95 °C por 4 minutos e executadas em mini gel desnaturante 12% SDS-PAGE utilizando o sistema tampão gel/eletrodo de tris-glicina contendo SDS pH 8,3 (LAEMMLI, 1970). O gel foi corrido a uma corrente constante de 200 V (Figura 19) e, em seguida, corado utilizando coloração Coomassie Azul R-250 ou coloração com prata (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) e coloração nitroblue tetrazólio (NBT) em 2 mol.L^{-1} glicinato (WAITE, 1995). Para estimar a massa molar aparente das proteínas, a eletroforese foi realizada na presença de marcadores de baixo peso molecular: fosforilase b (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbonica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), e lisozima (14,4 kDa).

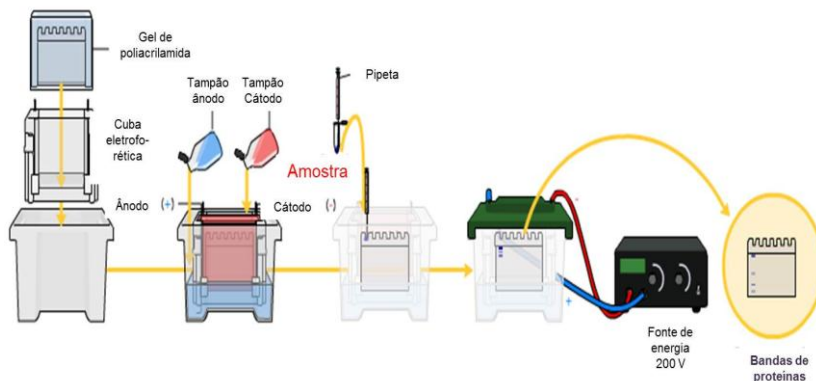
Antes da digestão trípica das proteínas e espectrometria de massa, purificamos as proteínas a partir do gel de poliacrilamida.

3.2.7 Purificação das proteínas

Ao término da eletroforese, com auxílio de uma lâmina limpa, foram removidas duas colunas à direita do gel (incluindo o marcador de massa molecular e a primeira coluna com amostra de proteína), as quais foram coradas com nitrato de prata. Durante este período o gel foi mantido na placa de vidro. As colunas de gel coradas foram alinhadas com a porção do gel não corada, e a região que presumidamente continha a banda de proteína de interesse foi removida e cortada em pequenos pedaços. Os fragmentos de gel obtidos foram completamente imersos em água destilada e realizou-se a incubação sob refrigeração por

24 horas. O sobrenadante foi obtido por centrifugação a 5.000 g por 10 minutos e em seguida submetido a nova eletroforese SDS-PAGE.

Figura 19 - Fluxograma eletroforese em mini gel de poliacrilamida 12% (m/v) SDS-PAGE.



3.2.8 Digestão *in gel*, espectrometria de massa e identificação das proteínas

As bandas do gel foram retiradas manualmente e descoradas com três lavagens utilizando 500 μL de solução de descoloração contendo 50 mmol.L^{-1} de bicarbonato de amônio e 50% (v/v) de acetonitrila e, em seguida desidratadas com 100 μL de acetonitrila 100%. Os fragmentos do gel foram secos em sistema de concentração a vácuo (Eppendorf). Após a secagem, os fragmentos do gel foram reidratados em 150 μL de solução de redução (10 mmol.L^{-1} DTT, 10 mmol.L^{-1} bicarbonato de amônia) por 30 minutos a 56 °C. A solução de redução foi descartada e foi adicionado 100 μL de solução de alquilação (50 mmol.L^{-1} iodoacetamida, 100 mmol.L^{-1} bicarbonato de amônia) por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. A solução de alquilação foi descartada, 500 μL de solução de lavagem foi adicionada e, em seguida o gel foi desidratado com 100 μL de acetonitrila 100% e depois foram secos em sistema de concentração a vácuo (Eppendorf). Após secos, os fragmentos do gel foram colocados em gelo e adicionados 10 μL de solução de protease (Trypsina Gold, Promega) a 10 $\mu\text{g/mL}$ em 25 mmol.L^{-1} bicarbonato de amônio e incubados por 16 horas a 37 °C. Após a incubação os peptídeos tripticos foram extraídos em três passos de extrações com solução contendo 30 μL de 50% (v/v) acetonitrila e

5% (v/v) ácido trifluoroacético por 30 minutos. Finalmente os extratos de peptídeos concentrados foram secos em sistema à vácuo e estocados a -20 °C até a análise.

A análise por espectrometria de massa (EM) foi feita em espectrômetro MALDI-TOF Autoflex spectrometer (Bruker Daltonics) no Centro de Biologia Molecular e Estrutural/CEBIME/UFSC. Os peptídeos extraídos foram ressuspensos em 10 µL ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) e uma amostra de 1 µL da digestão concentrada foi misturada à solução de matriz saturada de ácido ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em 0,1% (v/v) TFA em 1:1 acetonitrila/metanol). Metade desta mistura foi aplicada na placa de MALDI (Bruker Daltonics) para cristalizar em temperatura ambiente. O espectro foi adquirido em modo íon positivo usando uma voltagem de aceleração de 20 kV e frequência de laser de 50 Hz. A calibração externa foi feita usando uma mistura de peptídeos com 200 tiros para cada espectro de calibração (4 passos de 50 tiros) sempre que possível. Os espectros das amostras foram obtidos por acúmulo de 200 tiros e analisados pelo software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). O padrão de massas obtido para cada amostra foi comparado com o padrão de massas gerado “*in silico*”, a partir do banco de dados do NCBI^{nr} usando o programa MASCOT (www.matrixscience.com). Os parâmetros de busca foram cisteínas carbamidometiladas e metioninas oxidadas.

3.3 Resultados e Discussão

Após a tentativa de extrair as proteínas diretamente da estrutura bissal sem a obtenção de resultados, o trabalho foi concentrado na extração a partir do órgão que as produz e as armazena, o pé do mexilhão.

Neste trabalho, dois métodos diferentes de extração das proteínas do pé do mexilhão *P. perna* (extração com PCA e extração com ácido acético/inibidores de proteases) foram utilizados. As proteínas do pé dos mexilhões coletados em fevereiro de 2012 foram extraídas através do método descrito por Waite (1995), que consiste em extrair as proteínas em meio aquoso acidificado com PCA 0,7% (v/v) e precipitá-las por meio da adição de solvente orgânico, a acetona gelada (Figura 17). Este método foi desenvolvido para extrair exclusivamente a proteína de revestimento da cutícula do bisso, a mfp 1 e, a proteína do núcleo da placa do bisso, a mfp 2.

As proteínas do pé dos mexilhões aclimatados em laboratório foram extraídas pelo método descrito por Hwang et al. (2010), que

consiste na extração das proteínas com uma solução de ácido acético 0,5% (v/v) e inibidores de proteases, estes para evitar a degradação das proteínas. Este método possui várias etapas e cada uma delas indica caminhos para extrair diferentes proteínas. Neste trabalho, utilizamos duas etapas deste método, a etapa 1 que extrai as proteínas mfp 1, 2, 6 e o colágeno e, a etapa 2 que extrai a proteína mfp3 (Figura 18). Os procedimentos de extração das proteínas mfp 4 e 5 não foram apresentados.

Foi observado que durante os dez dias em que os mexilhões permaneceram em condições laboratoriais, aqueles em que os biscoitos foram cortados, sintetizaram cerca de seis a dez biscoitos diários. Os que não tiveram os biscoitos cortados também sintetizaram, porém em quantidade menor.

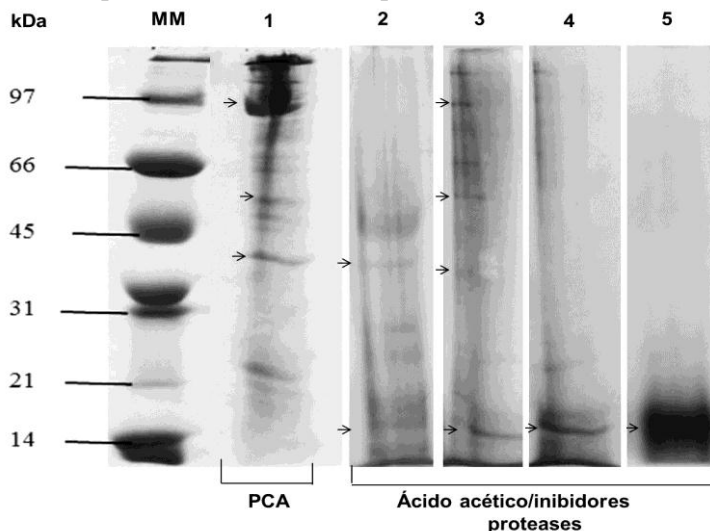
A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE e além desse método, foram testados gel nativo e gel bidimensional que foram corados com Coomassie Blue R-250 e com prata, porém não apresentaram resultados relevantes. Algumas pesquisas citam a separação das proteínas do biscoito com gel de poliacrilamina ureia-PAGE, método não reproduzido por esta pesquisa.

A separação das proteínas realizada por SDS-PAGE pode ser vista na figura 20. Na raia 1 foi aplicada uma alíquota da amostra das proteínas extraídas por PCA 0,7 % (v/v). Nas raias de 2 a 5 foram aplicadas alíquotas de proteínas extraídas por ácido acético 5% (v/v) e inibidores de proteases. As amostras aplicadas nas raias 2 e 4 são das proteínas extraídas dos mexilhões que não tiveram os biscoitos cortados e nas raias 3 e 5 são das proteínas extraídas dos mexilhões com os biscoitos cortados.

Na raia 1 pode ser observada uma maior variedade de bandas proteicas do que nas raias 2 e 3, com massas moleculares que variam de 97 kDa até 21 kDa. Assim como, a raia 3 apresenta maior variedade de bandas proteicas do que a raia 2, com massas moleculares acima de 45 kDa.

Nas raias 4 e 5, com amostras extraídas na etapa 2, pode ser observada a presença de uma banda proteica majoritária correspondente a 14 kDa. Na raia 5, a intensidade desta banda majoritária é maior que na raia 4. Pode ser observado, que nas raias 2 e 3 esta banda correspondente a 14 kDa também está presente, demonstrando que esta proteína, que deveria ter precipitado (P1) na centrifugação, continuou presente em menor quantidade no sobrenadante (S1) (Figura 18).

Figura 20 - Gel de eletroforese 12% SDS-PAGE das proteínas do pé do mexilhão *P. perna*. (MM) Marcadores de baixa massa molar; Raia 1, proteínas extraídas por PCA 0,7% (v/v); Raias 2 a 5, proteínas extraídas por ácido acético/inibidores de proteases; Raia 2, sem corte dos bisco; Raia 3, com corte dos bisco; Raia 4, proteínas extraídas na etapa 2, sem corte do bisso; Raia 5, proteínas extraídas na etapa 2, com corte do bisso.



Neste trabalho, os perfis protéicos da eletroforese 12% (m/v) SDS-PAGE das amostras analisadas mostraram concordância com o conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford (Figura 21). Entretanto, é de fundamental importância que nos próximos trabalhos sejam efetuadas triplicatas para confirmar estes resultados.

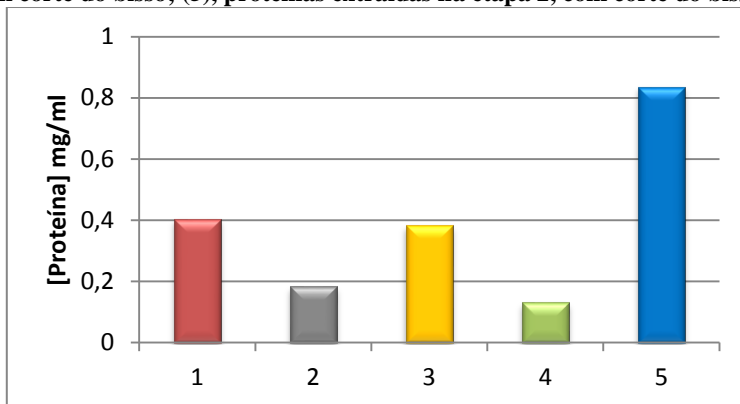
O método de extração por PCA 0,7% (v/v) foi desenvolvido para extração das proteínas mfp1 e 2, nas quais, nas espécies do gênero *Mytilus* as massas molares estão entre 108 a 90 e 45 kDa respectivamente. Na raia 1, pode ser observada uma banda de 97 kDa e outra banda próxima a 45 kDa, a primeira observada também na raia 3 e a segunda na raia 2.

Assim como nas raias 4 e 5, em que o método de extração sugere que seja encontrada a proteína mfp 3 (que na espécie *M. edulis* a massa molar é 6 kDa), pode ser observado uma banda majoritária na faixa de 14 kDa.

As duas bandas da raia 1, a de 97 kDa e a de cerca de 37 kDa, ao término da eletroforese, com auxílio de uma lâmina limpa, foram

removidas e eluídas do gel SDS-PAGE, conforme o método de purificação de proteínas a partir do gel de poliacrilamida e, foram aplicadas em uma nova eletroforese SDS-PAGE (Figura 22). Outros estudos sugerem métodos de purificação em filtração em gel com Sephadex G-200 (WAITE, 1983) ou coluna Shodex KW-803 (ZHAO E WAITE, 2005), HPLC fase reversa C8 (BURZIO et al., 2000); ou até em três etapas: filtração em gel, HPLC fase reversa C8 e novamente filtração em gel (ZHAO et al, 2009), métodos não reproduzidos nesta pesquisa.

Figura 21 - Proteínas totais (mg/mL) das amostras de proteínas do pé do mexilhão *P. perna*. (1), proteínas extraídas por PCA 0,7% (v/v); (2 a 5), proteínas extraídas por ácido acético/inibidores de proteases; (2), sem corte dos biscoitos; (3), com corte dos biscoitos; (4), proteínas extraídas na etapa 2, sem corte do biscoito; (5), proteínas extraídas na etapa 2, com corte do biscoito.

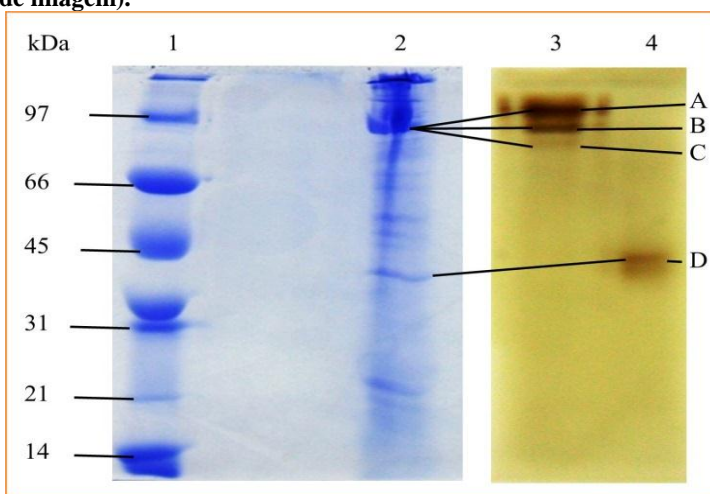


Nesta nova corrida de eletroforese em gel 12% SDS-PAGE foi identificada a presença de três bandas de proteína na faixa de aproximadamente 97 kDa (proteína A, B e C) e uma banda de proteína na faixa de aproximadamente 37 kDa (proteína D) (Figura 22 – raias 3 e 4).

O aparecimento de três bandas na faixa de 97 kDa onde na primeira corrida só havia uma banda chamou a atenção. A hipótese é que na primeira corrida, onde havia uma mistura complexa de proteínas, estas três proteínas com tamanhos parecidos migraram através do gel com velocidades similares, pois suas estruturas nativas foram completamente desdobradas pelo SDS, de maneira que elas se ligaram a uma mesma quantidade de SDS tendo, portanto, a mesma quantidade de cargas negativas. Na segunda corrida, com poucas proteínas na solução

e submetida novamente a forças elétricas, presumidamente, as proteínas se separaram.

Figura 22 - Perfil de separação de proteínas do pé do mexilhão *P. perna* através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % SDS-PAGE. Raia 1: marcadores de baixa massa molar; Raia 2: amostra de proteína extraída por PCA 0,7% do pé de mexilhão e coradas em Coomassie Blue R-250; Raia 3: amostra da proteína eluída a partir da banda de proteína removida da faixa de 97 kDa da raia 2 e corada com prata (somente para registro de imagem); Raia 4, amostra da proteína eluída a partir da banda de proteína removida da faixa de 37 kDa da raia 2 e corada com prata (somente para registro de imagem).



As quatro bandas denominadas A, B, C e D foram removidas do gel, digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massas MALDI-TOF. O padrão de massas obtido para cada amostra foi comparado com o padrão de massas gerado *in silico* usando o programa MASCOT.

As sequências peptídicas das proteínas obtidas no programa MASCOT foram analisadas confrontando-as com o banco de dados. As buscas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foram feitas pelo site NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) contra bancos de dados não redundantes.

Das quatro bandas de proteínas analisadas, três são similares à proteínas do bisso e a outra é similar à uma proteína que talvez não esteja presente no bisso do mexilhão (Tabela 3). Na proteína da banda

A, dois peptídeos foram sequenciados, exibindo similaridade com a proteína da matriz do filamento 1 (tmp 1) variante *a* da espécie *M. edulis* (Acesso: AAL 83537). A tmp 1 é uma proteína não colágena presente no núcleo do filamento e parece exercer o papel de lubrificar as microfibrilas de colágeno e auxiliar na manutenção do bisso após este ser submetido a um esforço que tende a alongá-lo ou esticá-lo até a ruptura (SILVERMAN; ROBERTO, 2010).

Os peptídeos sequenciados das bandas B e C mostraram similaridade com os peptídeos da proteína do pé 2 (mfp 2) da espécie *M. edulis* (Acesso: AAX2372 e AAX23970, respectivamente). A mfp 2 faz parte do núcleo da placa bissal e tem ação de tornar estável o animal no substrato. Interage diretamente com a mfp 5 e entre si por ligações mediadas por Ca^{2+} e Fe^{3+} .

A proteína da banda D mostrou homologia com uma proteína fibrinogênica relacionada com a proteína 1 da espécie *M. californianus*. Esta proteína está relacionada com um domínio de superfamília de imunoglobulinas e, ligada a importantes processos de defesa, tais como aglutinação, lise bacteriana, reconhecimento de patógenos e outros parasitas (HANINGTON; ZANG, 2011). Esta proteína fibrinogênica não faz parte das proteínas bissais das espécies estudadas e descritas na literatura. Como a espécie *P. perna* não tem estes dados descritos na literatura, pode ser que nesta espécie esta proteína faça parte do bisso.

As Figuras 23, 24, 25 e 26 mostram o alinhamento dos fragmentos das sequências peptídicas deduzidas das bandas A, B, C e D com as sequências peptídicas das proteínas identificadas. Os aminoácidos não idênticos, mas com propriedades físico-químicas preservadas, são considerados como positivos. Inserções de espaço para obtenção de melhor alinhamento são denominadas lacunas (*gaps*). Estes alinhamentos foram obtidos utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) na página do NCBI.

Tabela 3 - Bandas de proteínas (obtidas na Figura 22) analisadas por MALDI-TOF e identificadas por busca em banco de dados NCBI.

BANDA	IDENTIDADE DA PROTEÍNA	ACESSO	SCORE	COBERTURA	PEPTÍDEOS SEQUENCIADOS
A	Proteína da matriz proximal do filamento 1 variante a (<i>Mytilus edulis</i>)	AAL83537	18	64%	MEENK.N K.LENLLK.L
B	Proteína do pé 2 (<i>Mytilus edulis</i>)	AAX23972	21,2	11%	R.VVAEGLGYNVTWSQADKR.V K.IFNNTLVPIR.F K.AVQFDGMSSVTIDYDGVKPNK.A R.YAVGPKSTTLR.I K.STTLRIVLDL.K.S K.VVIDAGHGGK.D R.AESKPFAQIMHK.Y R.ETTMPAILLESGYLSNASDTK.V K.VLFDDATQNR.I
C	Proteína do pé 2 (<i>Mytilus edulis</i>)	AAX23970	25,4	13%	M.RTEPEMLDLILQTAK.T R.TEPEMLDLILQTAK.T R.IIEQHNVLEHR.H R.IDLTLCPEYIK.E K.GLFAPYSPSPQR.Y R.YWTSPASQTDFEK.A K.NYKHLFNYPAEK.E K.LFHQEAQSLANK.M K.LFHQEAQSLANKMGFDYDK.E K.MGFDYDKEVAER.M K.MGFDYDKEVAER.M
D	Fibrinogênio relacionado com a proteína 1 (<i>Mytilus californianus</i>)	DAA34036	20,8	52%	R.NLLTGLVRHER.I R.IEAPWAR.V R.VDEMR.G K.LIDYGKLGDTNER.A K.LGDTNERAMR.M R.MADFWLTEKDLIPK.L K.LFQVLAPRYK.D K.MAVIEYKGNCLPLPLPSGPSSG.

Figura 23 - Em destaque está a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína da banda A (Query) com os peptídeos da tmp 1 variante a da espécie *M. edulis* (Sbjct)).

proximal thread matrix protein 1 variant a [Mytilus edulis]
Sequence ID: [gb|AAL83537.1|AF414454_1](#) Length: 441 Number of Matches: 2

Range 1: 411 to 423 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
18.0 bits(35)	0.007	7/13(54%)	7/13(53%)	4/13(30%)

Query 6 NKL----ENLLKL 14
 NKL FN KL
Sbjct 411 NKLSKIMENVVKL 423

Range 2: 217 to 223 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
15.5 bits(29)	0.062	5/7(71%)	5/7(71%)	0/7(0%)

Query 8 LENLLKL 14
 L LLKL
Sbjct 217 LSTLLKL 223

Figura 24 - Em destaque está a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína B (Query) com os peptídeos da proteína mfp-2 da espécie *M. edulis* (Sbjct).

foot protein 2 [Mytilus edulis]
Sequence ID: [gb|AAX23972.1|](#) Length: 429 Number of Matches: 2

Range 1: 53 to 68 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.2 bits(43)	0.013	Compositional matrix adjust.	7/16(44%)	8/16(50%)	0/16(0%)

Query 46 IDYDGVIKENKARYAV 61
 Y+GV KEN Y
Sbjct 53 CKYNGVCKPENGGSYKC 68

Range 2: 75 to 127 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.0 bits(40)	0.040	Compositional matrix adjust.	13/54(24%)	21/54(38%)	3/54(5%)

Query 7 LGYNVTWSQADKRVKIFNNVTILVPI--RFKAVQFDGMSSVTIDYDGVIKENKAR 58
 GYN A K + N +P+ +K V +G + + V PN +
Sbjct 75 YGYNCNLAKNACKPKNQCKNKSRCIPVGKTYKVCVRNGNYGRLCEKN-VCSFPNFK 127

Figura 25 - Em destaque está a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína C (Query) com os peptídeos da proteína mfp-2 da espécie *M. edulis* (Sbjct).

foot protein 2 [*Mytilus edulis*]
 Sequence ID: [gb|AA23970.1](#) Length: 504 Number of Matches: 1

Range 1: 20 to 43 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
25.4 bits(54)	0.001	Composition-based stats.	10/24(42%)	14/24(58%)	2/24(8%)

Query 54 PKEYIKEKGLFAP--YSPSPQRYR 75
 P+ Y ++ + P Y PSP RYR
 Sbjct 20 PRPYDDDEDDYTPFVYKPSPSRYR 43

Figura 26 - Em destaque esta a sequência de alinhamento obtida dos peptídeos da proteína D (Query) com a proteína fibrogênica relacionada com a proteína 1 da espécie *M. californianus* (Sbjct).

TPA_inf: fibrinogen-related protein 1 [*Mytilus californianus*]
 Sequence ID: [tpg|DAA34036.1](#) Length: 230 Number of Matches: 1

Range 1: 106 to 160 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
20.8 bits(42)	0.005	Compositional matrix adjust.	16/57(28%)	27/57(47%)	2/57(3%)

Query 50 NERAMRMMADEFWLTKDLIPKIKLEQVLA PRYKDKMAVIFVYKGNCLPLPLPSGPS 106
 + A+R+ +ADF T K + K F V + K ++ + + GN L +G S
 Sbjct 106 DNHALRIELADFNGTSK--YAEYKNFSVSSEPNKYRLLKGFSGNAGDALTLGLNGHS 160

Neste trabalho, o alinhamento das sequências peptídicas entre as espécies envolvidas é apenas uma hipótese de que as espécies são homólogas, pois os scores das bandas proteicas isoladas A, B, C e D, em relação às proteínas identificadas de outras espécies, estão abaixo do valor significativo e, isso indica que os resultados possam ser um evento randômico.

CONCLUSÃO

O presente trabalho originou as primeiras observações sobre as proteínas do bisso do mexilhão *P. perna*. Há décadas estas proteínas vêm sendo pesquisadas a partir de outras espécies, principalmente da espécie *M. edulis*, e a cada pesquisa realizada mostra-se o quanto importante elas são para o desenvolvimento de novos produtos adesivos, tanto para aplicação na indústria como na medicina, devido ao seu excepcional desempenho adesivo em ambientes úmidos, turbulentos e com água salina como a do mar.

A identificação das proteínas adesivas do bisso, extraídas a partir do pé do mexilhão, demandou muitos ensaios até que se chegasse à definição de que os métodos aqui descritos possam contribuir para estudos futuros.

O trabalho mostrou, através do perfil de eletroforese, que as proteínas do bisso podem ser isoladas logo após a coleta dos mexilhões e que se houver aclimação, a remoção dos bissos logo após a coleta é recomendável, porque a síntese de novos bissos para a adesão no novo substrato aumenta a concentração das proteínas adesivas no pé do animal.

Dos métodos de extração apresentados, embora necessite de validação e otimização, o da extração com ácido acético/inibidores de proteases demonstrou-se melhor do que o método de extração por PCA 0,7%, porque além de requerer menos quantidades de solventes químicos, conduz a extração não só das proteínas mfp 1 e 2, mas também de colágeno, mfp 3, 4, 5 e 6.

A purificação das proteínas foi realizada a partir do gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE. A associação desta técnica e da espectrometria de massa mostrou-se adequada para a identificação protéica, entretanto, faz-se necessário aprimorar o método para obtenção de valores de pontuação (scores) maiores às proteínas identificadas.

O principal objetivo deste trabalho, a identificação das proteínas do bisso do mexilhão *P. perna*, foi alcançado, embora os resultados obtidos tenham sido incipientes e indiquem a necessidade de continuidade.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C.M.M.; FERREIRA, J.F.; MAGALHÃES, A.R.M. Desenvolvimento embrionário do mexilhão *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) I Dados preliminares. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 3, p. 280, set. 1993.
- ARCHER, M. R. B.; MORETTO, E. Occurrence of *Vibrio Parahaemolyticus* in Mussels (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) from a Natural Coastal Bed in the Municipality of Palhoça, Santa Catarina, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p. 379-386, julho/set. 1994.
- ARNOW, E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 118, p. 531-537, 1937.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976.
- BILIC, G.; BRUBAKER, C.; MESSERSMITH, P.B.; MALLIK, A.S.; QUINN, T.M. Injectable candidate sealants for fetal membrane repair: bonding and toxicity *in vitro*. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 202, p. 202-285, 2010.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micobram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, C.H. Some Strutural Proteins of *Mytilus edulis*. **Journal of Microscopical Science**, v. 3-93, p. 487-502, 1952.
- BRUBAKER, C.E.; MERSSERSMITH, P.B. The Present and Future of Biologically Inspired Adhesive Interfaces and Materials. **Langmuir**, v. 28, p. 2200-2205, 2012.

BURZIO, L.O.; GUTIERREZ, E.; PARDO, J.; DE LA FUENTE, E.; BRITO, M.; SAEZ, C. Bioadhesives: a biotechnological opportunity. **Archivos de biología y medicina experimentales**, Santiago, v. 23, p. 173-178, 1990.

BURZIO, V.A.; SILVA, T.; PARDO, J.; BURZIO, L. O. Mussel adhesive enhanced the immobilization of human chorionic gonadotrophin to a solid support. **Analytical Biochemistry**, v. 241, p. 190-194, 1996.

BURZIO, L. O.; BURZIO, V.A.; SILVA, T.; BURZIO, L.A.; PARDO, J. Environmental bioadhesion: themes and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 309-312, 1997.

BURZIO, L.A.; SAEZ, C.; PARDO, J.; WAITE, J.H.; BURZIO, L.O. The adhesive protein of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) and *Aulacomya ater* (Molina, 1782): a proline-rich and a glycine-rich polyphenolic protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1479, p. 315-320, 2000.

BYERN, J. VON; GRUNWALD, I. Biological Adhesive Systems. In: **Nature to Technical and Medical Application**. Austria: Springer-Verlag/Wien, p. 201-210, 2010.

CARMO, T.M.S, COSTA, M.B. & SIQUEIRA, H.P.. **Determinação do valor nutritivo da carne de mexilhões, *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia)**: Estudos sobre o teor de proteínas, lípidos, glicogênio e água. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, v. 36, p. 750, 1984.

CARRINGTON, E. Seasonal variation in the attachment strength of Blue Mussels: causes and consequences. **Limnology and Oceanography**, v. 47, n. 6, p. 1723-1733, 2002.

CRISP, D.J.; WALTER G., YOUNG, G.A.; YULE, A.B. Adhesion and substrate choice in mussels and barnacles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 104, p. 40-50, 1985.

DALSIN, J.L.; MESSERSMITH, P. Bioinspired antifouling polymers. **Materials Today**, v.46, p.8-38, 2005.

DENNY, M. W. **Biology and the mechanics of the waveswept environment**. New Jersey, USA: Princeton University Press, 1988.

FARIAS, T. Z.; MAGALHÃES, A.R.M. Presença do mexilhão *Perna perna* em sítios arqueológicos no Estado de Santa Catarina. In: XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2002, Itajaí. Resumos do XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2002. p. 47-48.

FERREIRA, J. F.; MAGALHÃES, A. R. M. **Cultivo de mexilhões**. In: Aqüicultura: Experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2004, p. 221 – 250.

FILPULA, D.R.; LEE, S.M.; LINK, R.P.; STRAUSBERG, S.L. STRAUSBERG, R.L. Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. **Biotechnology Progress**, v. 6 p. 171-177, 1990.

GALVÃO, J.A. **Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. 2004, 128 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GARCIA, P.; MAGALHÃES, A.R.; FERREIRA, J.F. **Ocorrência de hermafroditismo no mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Bivalvia, Mytilidae)**. In: XII Encontro Brasileiro de Malacologia, 1991. São Paulo. Resumo do XII Encontro Brasileiro de Malacologia. São Paulo: 1991. p.66.

HANINGTON, P. C.; ZHANG, SI-MING. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates li defense, not coagulation. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, p. 17-27, 2011.

HANSEN D.C.; DEXTER, S.C.; WAITE, J.H. The inhibition of corrosion of S30403 stainless stell by a naturally occurring catecholic polymer. **Corrosion Science**, v. 37, p. 1423-1441, 1995.

HOLTEN-ANDERSEN, N.; WAITE, J.H. Mussel-designed protective Coatings for Compliant Substrates. **Journal of Dental Research**, v. 87. p. 701-709, 2008.

HWANG, D.S.; ZENG, H., MASIC, A. HARRINGTON, M.J. ISRAELACHVILI, J.N., WAITE, J.H. Protein- and Metal-dependent interactions of a prominent protein in mussel adhesive plaques. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 25850-25858, 2010.

LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680–685, 1970.

LEE, B.; DALSIN J.L.; MESSERSMITH, P.B. Biomimetic adhesive polymers based on mussel adhesive proteins. In: SMITH, A.M.; CALLOW, J.A., editors. Biological Adhesives. Springer-Verlag; Berlin: p. 257–78. 2006.

LEE, H.; LEE, B.P.; MESSERSMITH, P.B. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. **Nature**, v. 448, p. 338-341, 2007.

LEE, B.P.; MESSERSMITH, P.B.; ISRAELACHVILI, J.N.; WAITE, J.H. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. **Annual Review of Materials Research**, v. 41, p. 99-132, 2011.

LIN, Q., GOURDON, D., SUN. C., HOLTEN-ANDERSEN, N. ANDERSON, T.H., WAITE, J.H., ISRAELACHVILI, J.N. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 3782-3786, 2007.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da Reprodução de Mexilhões (*Mytilus perna* L. Mollusca Lamellibranchia). **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, n. 26, p. 33-111, 1969.

MAGALHÃES, A.D. **Análise proteômica de Trypanosoma cruzi: construção de mapas bidimensionais em pH alcalino**. Dissertação (Mestrado) 2006, 67p. Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2006.

MAGALHÃES, A.R.M. **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné,1758 (Mollusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual**. 1985. 117p. São Paulo – USP. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1985.

MARENZI, A.W.C. **Aspectos biológicos e econômicos do cultivo de mexilhões *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca-Bivalvia), no litoral centro-norte catarinense.** 1992. 134p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1992.

MARQUES, H.L.A. **Considerações ecológicas sobre o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) em bancos naturais da região de Ubatuba, São Paulo, Brasil.** 1988, 108p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1988.

MAUGH, K.J.; ANDERSON, D.M.; STRAUSBERG, S.L.; McCANDILISS R.; WEI, T; FILPULA, D. Recombinant bioadhesive proteins of marine animals and their use in adhesive compositions. USA Patent no. 87-US3048. 1988.

PAUNESKU, T.; RAJH, T.; WIEDERRECHT, G.; MASER, J.; VOGT, S. Biology of TiO₂-oligonucleotide nanocomposites. **Nature Materials**, v. 2, p. 343–46, 2003.

SANTA CATARINA. EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese informativa da Produção de Moluscos em 2011.** Florianópolis, 2012. Disponível em: http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=140&Itemid=173 Acesso em 30/01/2013.

QIN, X.; WAITE, J. H. Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198. p. 633–644, 1995.

QIN, X.; WAITE, J. H. A potential mediator of collagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 95. p. 10517–10522, 1998.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados.** 6 ed. São Paulo: Rocca. 1996.

SALOMÃO, L.C.; MAGALHÃES, A.R.M.; LUNETTA, J.E. Influência da salinidade na sobrevivência de *Perna perna* (molusca: Bivalvia). **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 4, p. 143-152, 1980.

SAGERT, J., WAITE, J.H. Hyperunstable matrix proteins in the byssus of *Mytilus galloprovincialis*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 2224-2236, 2009.

SHAO, H.; BACHUS, K.N.; STEWART, R.J. A water-borne adhesive modeled after the sandcastle glue of *P. californica*. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, p. 464-471, 2009.

SHAO H.; STEWART, R.J. Biomimetic underwater adhesives with environmentally triggered setting mechanisms. **Advanced Materials**, v. 22, p. 729-733, 2010.

SILVERMAN H.G.; ROBERTO, F.F. Understanding Marine Mussel Adhesion. **Marine Biotechnology**, v. 9, p.661-681, 2007.

SILVERMAN, H.G., ROBERTO, F.F.. **Byssus formation in *Mytilus***. In: Von BYERN, Von; GRUNWALD, I. Biological Adhesive Systems. Wien: Springer-Verlag, 2010, p. 273-283.

SPENCER, B.E. **Molluscan Shellfish Farming**. 1 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2002, p. 147-165.

SUN, C., LUCAS, J.M., WAITE, J.H. Collagen-Binding Matrix Proteins from Elastomeric Extraorganismic Byssal Fibers. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 1240-1248, 2002.

TAMARIN, A., KELLER, P.J. An ultrastructural study of the byssal thread forming system in *Mytilus*. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 40, p. 401-416, 1972.

TAMARIN. A., LEWIS, P., ASKEY, J. The structure and formation of the byssus attachment plaque in *Mytilus*. **Journal of Morphology**, v. 149, p. 199-221, 1976.

TATEHATA, H.; MOCHIZUKI, A.; KAWASHIMA, T.; YAMASHITA, S.; YAMAMOTO, H. Model polypeptide of mussel adhesive protein. I. Synthesis and adhesive studies of sequential polypeptides (X-Tyr-Lys)_n and (Y-Lys)_n. **Journal of applied polymer science**, v. 76, p. 929-937, 2000.

TAYLOR S.W.; WAITE, J.H. trans-2,3-cis-3,4-Dihydroxyproline, a New Naturally Occurring Amino Acid, Is the Sixth Residue in the Tandemly Repeated Consensus Decapeptides of an Adhesive Protein from *Mytilus edulis*. **Journal American Chemistry Society**, v. 116, p. 10803-10804, 1994.

TOIVONEN, P.M.A.; BRUMMELL, D.A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 1-14, 2008.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003, 331 p.

VAN WINKLE, W. Effect of environmental factors on byssal thread formation. **Marine Biology**, v. 7, n. 2, p. 143-148, 1970.

YAMAMOTO, H. Adhesive studies of synthetic polypeptides: a model for marine adhesive proteins. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v.1, p. 177-183, 1987.

YANG, C.; YANG, Z.; GU, H.; CHANG, C.K.; GAO, P.; XU, B. Facet-selective 2D self-assembly of TiO₂ nanoleaves via supramolecular interactions. **Chemistry of Materials**, v. 20, p. 7514-20, 2008.

YIN, M.; YUAN, Y.; LIU, C.; WANG, J. Development of mussel adhesive polypeptide mimics coating for in-situ inducing re-endothelialization of intravascular stent devices. **Biomaterials**, v. 30, p. 2764-73, 2009.

YU, M.; DEMING, T.J. Synthetic polypeptide mimics of marine adhesives. **Macromolecules**, v. 31, p. 4739-45, 1998.

WAITE, J.H. Evidence for a repeated 3,4-dihydroxy-phenylalanine and hydroxyproline containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel *Mytilus edulis*. **The Journal Biological Chemistry**, v. 258, p. 2911-2915, 1983.

WAITE, J.H. Nature's underwater adhesive specialist. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 7, p. 9-14, 1987.

WAITE, J.H. The formation of mussel byssus: anatomy of a natural manufacturing process. **Results and Problems in Cell Differentiation (Biopolymers)**, v. 19, p. 27-54, 1992.

WAITE, J.H. Precursors of Quinone Tanning: Dopa-Containing Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 258, p. 1-20, 1995.

WAITE, J.H. Reverse engineering of bioadhesion og marine mussels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.875, p. 301-309, 1999.

WAITE, J.H., QIN, X. Polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis*. **Biochemistry**, v. 40, p. 2887-2893, 2001.

WAITE, J.H.; TANZER M.L. Polyphenolic substance of *Mytilus edulis* – novel adhesive containing L-DOPA and hydroxyproline. **Science**, v. 212, n. 4498, p. 1038-1040, 1981.

WIEGEMANN, M. Adhesion in blue mussel (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): mechanisms and technical applications. **Aquatic Science**, v. 67, p. 166-176, 2005.

WILKER, J.J. Marine bioinorganic materials: mussels pumping iron. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, p. 276-283, 2010.

WINSLOW, B.D.; SHAO. H.; STEWART, R.J.; TRESCO, P.A. Biocompatibility of adhesive complex coacervates modeled after the sandcastle glue of *Phragmatopoma californica* for craniofacial reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, p. 9373-91, 2010.

WOOD, A.R.; APTE, S.; MACVOY, E.S.; GARDNER, J.P.A. A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 685-698, 2007.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L. **Biologia molecular Básica**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 403 p.

ZHAO, H.; WAITE, J.H. Coating Proteins: Structure and Cross-Linking in fp-1 from the Green Shell Mussel *Perna canaliculus*. **Biochemistry**, v. 44, p. 15915-15923, 2005.

ZHAO, H.; SAGERT, J.; HWANG, D.S.; WAITE, J.H. Glycosylated Hydroxytryptophan in a Mussel Adhesive Protein from *Perna viridis*. **Journal Biological Chemistry**, v. 284, p. 23344-52, 2009.